

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung des kardialen β -adrenergen Phosphoproteoms

Petra Göbel
aus
Ingolstadt

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 01.02.2012

Petra Göbel

Dissertation eingereicht am 12.12.2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 24.01.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Phosphorylierung als molekularer Schalter.....	7
1.1.1	Phosphorylierung, eine posttranslationale Modifikation.....	7
1.1.2	Proteinkinasen und Phosphatasen.....	7
1.1.3	Die biologische Bedeutung der Phosphorylierung.....	8
1.2	Die kardiale Signaltransduktion des β -adrenergen Systems	9
1.2.1	Die β -adrenergen Rezeptoren des Herzens	9
1.2.2	Die Auswirkung chronischer β -adrenerger Stimulation auf das Myokard	11
1.2.3	Phosphorylierung als Modulator der kardialen Erregungs-Kontraktions-Kopplung (ECC)	12
1.3	Die Analytik der Proteinphosphorylierung.....	14
1.3.1	Trypsinverdau.....	16
1.3.2	Anreicherung phosphorylierter Peptide	16
1.3.3	Die massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierung	19
1.3.4	Datenbanksuche und Spektreninterpretation.....	23
1.3.5	Relative Quantifizierung der Phosphorylierung mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	24
1.4	Zielsetzung	26
2	Materialien und Methoden	27
2.1	Materialien.....	27
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Kits.....	27
2.1.2	Plasmide, Oligodesoxyribonukleotide	30
2.1.3	Puffer, Lösungen und Nährmedien	33
2.2	Methoden	40
2.2.1	Probengewinnung und Aufarbeitung zur massenspektrometrischen Analyse	40
2.2.2	Massenspektrometrische Analyse der angereicherten Phosphopeptide	44
2.2.3	Datenbanksuche und Spektreninterpretation.....	45
2.2.4	Echokardiographie	45
2.2.5	DNA-Analytik.....	45
2.2.6	Proteinanalytik.....	52
2.2.7	Zellkultur.....	59
2.2.8	Reporter-Gen-Assay	63
2.2.9	Intermolekularer Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....	63
2.2.10	Statistische Auswertung.....	65
3	Ergebnisse	66
3.1	Massenspektrometrische Analyse des murinen kardialen Phosphoproteoms	66
3.1.1	Stimulation β -adrenerger Rezeptoren in vivo	66
3.1.2	Proteolytischer Verdau	67
3.1.3	Nano-LC-MS/MS Phosphopeptid-Analyse nach IMAC- und TiO_2 -Anreicherung..	68
3.1.4	Das kardiale β -adrenerge Phosphoproteom	71
3.1.5	Relative Quantifizierung mittels MRM	76
3.2	Analyse der Phosphorylierungsstelle Serin 37 im MYOZ2.....	79
3.2.1	Charakterisierung des phosphorylierungsspezifischen pS37-MYOZ2 Antikörpers	79
3.2.2	Lokalisation von MYOZ2 und pS37-MYOZ2 im Zellkern.....	80
3.2.3	Lokalisation der S37-Mutanten an der Z-Scheibe und im Zellkern neonataler Rattenkardiomyozyten (NRCM)	83
3.2.4	Einfluss der S37-Phosphorylierung auf die Interaktion mit den bekannten Bindungspartnern	85
3.2.5	Einfluss der Phosphorylierungsstelle Serin 37 des MYOZ2 auf die Calcineurin-Signaltransduktion in NRCM.....	89
3.3	Analyse der Phosphorylierungsstelle Serin 567 im GPSM1	90

3.3.1	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von Serin 567 nach PKA-Aktivierung	91
3.3.2	Interaktion von Goloco S567-Cer, S567A-Cer und S567D-Cer mit G α i-YFP	92
3.3.3	Aktivierung G α i-gekoppelter Rezeptoren induziert eine Dissoziation des Goloco-Motivs und G α i	94
3.3.4	Einfluss β -adrenerger Signalwege auf die Goloco-G α i-Dissoziation.....	95
3.3.5	Einfluss der Phosphorylierung von Serin 567 auf die Dissoziation des G α i-Goloco-Komplexes in NRCM	98
3.3.6	Dissoziation von Goloco-Cer-G α i-YFP nach Überexpression β_1 -adrenerger Rezeptoren	101
3.3.7	Dissoziation von GPSM1-Cer-G α i-YFP nach GPCR-Aktivierung in NRCM	102
3.3.8	Quantitative Analyse der GPSM1-Cer-G α i-YFP-Dissoziation in Abhängigkeit von Serin 567	104
3.3.9	Anstieg der basalen Phosphorylierung von ERK1/2 nach Überexpression von GPSM1	106
3.3.10	Verdrängung von G $\beta\gamma$ aus der G α i-Bindung durch Überexpression von GPSM1	109
3.3.11	Regulation der subzellulären Lokalisation von GPSM1-HA in NRCM	110
4	Diskussion	112
4.1	Analyse des kardialen β -adrenergen Phosphoproteoms.....	112
4.1.1	Probengewinnung, proteolytischer Verdau und Aufreinigung.....	113
4.1.2	Phosphopeptid-Anreicherung.....	114
4.1.3	Datenanalyse und Spektreninterpretation	115
4.1.4	Das β -adrenerge Phosphoproteom.....	117
4.1.5	Differenzielle Analyse ausgewählter Phosphorylierungsstellen	119
4.2	Charakterisierung der Phosphorylierungsstelle Serin 37 des MYOZ2.....	120
4.2.1	Analyse der nukleären Lokalisation des MYOZ2	121
4.2.2	Analyse der Interaktion von MYOZ2 und dessen Bindungspartnern in Abhängigkeit von Serin 37.....	122
4.3	Funktionelle Charakterisierung von Serin 567 des GPSM1	124
4.3.1	Analyse der Goloco-G α i-Interaktion im Hinblick auf die Phosphorylierung an Serin 567	126
4.3.2	Reversible Dissoziation des Goloco-G α i-Komplexes nach G α i-gekoppelter Rezeptoraktivierung	127
4.3.3	Einfluss von phosphorylierungsspezifischen Mutanten und PKA-Stimulation auf die Goloco-G α i-Dissoziation	128
4.3.4	Quantitative Analyse der GPSM1-G α i-Dissoziation	129
4.3.5	Gesteigerte, basale ERK1/2-Phosphorylierung nach GPSM1-Überexpression ...	132
4.3.6	Stimulationsabhängige Änderung der GPSM1-Lokalisation in NRCM.....	133
5	Zusammenfassung.....	136
6	Summary	138
7	Literaturverzeichnis	140
8	Danksagung.....	151
9	Lebenslauf	152
10	Anhang	153
10.1	Peptidsequenzen der synthetischen Standardpeptide	153
10.2	MRM-Übergänge der ausgewählten Phosphopeptide	153
10.3	Phosphopeptide mit Zuordnung zu verschiedenen Proteinen.....	154
10.4	Identifiziert Phosphopeptide	155

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
Ala, A	Alanin
AMPK	5'-AMP-aktivierte Kinase
AR	adrenerger Rezeptor
Arg, R	Arginin
AS	Aminosäure
Asp, D	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
att	engl. <i>attachment site</i>
B-Mode	engl. <i>brightness modulation</i>
BCA	Bichinonin-4-Carbonsäure
bp	Basenpaare
BRET	engl. <i>bioluminescence resonance energy transfer</i>
BSA	bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav1.2	spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal
CCH	Carbachol
Cer	Cerulean
Ci	Curie
CID	engl. <i>collision-induced dissociation</i>
CoIP	Co-Immunopräzipitation
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMF	N, N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECC	Erregungs-Kontraktions-Koppelung
ERK	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FLNC	Filamin C
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FRMPD1	engl. <i>FERM and PDZ domain containing protein 1</i>
fw	engl. <i>forward</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GDI	engl. <i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
Glu, E	Glutamat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPR	engl. <i>G protein regulatory motif</i>
GPSM1	engl. <i>G protein signaling modulator 1</i>
HA	engl. <i>influenza hemagglutinin</i>
HEK 293-Zellen	engl. <i>human embryonic kidney 293-Zellen</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPSF	engl. <i>high purity salt free</i>
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IAA	Jodacetamid
IDA	Iminodiessigsäure
ifu	engl. <i>infectious units</i>
IMAC	engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>
kb	Kilobasenpaare
LacZ	β-Galactosidase
LDB3	engl. <i>LIM domain binding 3</i>
LMB	Leptomycin B
LV	linker Ventrikel
m/z	Masse zu Ladung-Verhältnis
MAP	engl. <i>mitogen-activated protein</i>

MCS	engl. <i>multiple cloning site</i>
MeCN	Acetonitril
MOAC	Metalloxid-Affinitätschromatographie
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
MYOZ1	Myozenin-1
MYOZ2	Myozenin-2
MYOZ3	Myozenin-3
NA	Noradrenalin
NES	nukleäres Exportsignal
NFAT	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NO	Stickoxid
NP-40	Nonylphenolethoxylat
NRCM	neonatale Rattenkardiomyozyten
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriessigsäure
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
PMF	engl. <i>peptide mass fingerprinting</i>
PPP3CB	Calcineurin A beta
pSer	Phosphoserin
pThr	Phosphothreonin
PTX	Pertussis Toxin
pTyr	Phosphotyrosin
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. <i>revolution per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rw	engl. <i>reward</i>
RyR	Ryanodin Rezeptor
S/N	engl. <i>signal to noise</i>
S37	Serin 37
S567	Serin 567
SDS	engl. <i>sodium dodecyl phosphate</i>
Ser, S	Serin
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
β-MeSH	β-Mercaptoethanol
TCAP	Telethonin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr, T	Threonin
Tnl	Troponin I
TPR	engl. <i>tetratricopeptide repeat</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr, Y	Tyrosin
ü. N.	über Nacht
USP	Ubiquitin spezifische Protease
UV	ultraviolett
YFP	engl. <i>yellow fluorescent protein</i>

1 Einleitung

1.1 Phosphorylierung als molekularer Schalter

1.1.1 Phosphorylierung, eine posttranslationale Modifikation

Eu- und Prokaryoten nutzen eine Reihe von Möglichkeiten, Proteine nach der Translation zu verändern. Durch das Anheften größerer Moleküle oder funktioneller Gruppen, beispielsweise Lipide, Phosphate, Acetate oder Zucker, an Aminosäurereste eines Proteins, aber auch durch Einfügen neuer Bindungen (z.B. Disulfidbrücken) oder Abspaltung von Aminosäuren kann die Natur von Proteinen modifiziert werden. Über 300 verschiedene Typen von posttranslationalen Modifikationen sind mittlerweile beschrieben¹, *FindMod* der bioinformatischen Portalseite ExPASy (<http://www.expasy.org>) listet eine Reihe dieser Modifizierungen auf, die sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch stattfinden können. Eine sehr häufige und zugleich sehr gut charakterisierte posttranslationale Modifikation stellt die enzymatische Phosphorylierung von Proteinen dar. Während in Prokaryoten die Phosphorylierung hauptsächlich an Histidin-, Glutamat- und Aspartatresten stattfindet, werden in eukaryotischen Proteinen vor allem drei Aminosäuren phosphoryliert: Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr). Über die Hydroxylgruppe dieser Aminosäuren werden mit Phosphatresten Phosphomonoester (O-Phosphate) gebildet, die in der Zelle in einer relativen Häufigkeit von 1800:200:1 für Phosphoserin (pSer), Phosphothreonin (pThr) und Phosphotyrosin (pTyr) vorkommen². Phosphorylierung von Tyrosinen erfolgt im Vergleich zur Serin- oder Threoninphosphorylierung vor allem an niedrig abundanten Proteinen und ist zudem instabiler, was die Diskrepanz der Häufigkeiten in der Phosphoaminosäure-Analyse erklären kann³.

1.1.2 Proteinkinasen und Phosphatasen

Katalysiert wird die reversible Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen, Enzyme, die mit ATP als Co-Substrat eine Phosphatgruppe auf einen Aminosäurerest übertragen. Eukaryotische Kinasen können anhand ihrer katalytischen Domäne in Ser/Thr-spezifische und Tyr-spezifische Kinasen unterteilt werden⁴, wobei allerdings auch Enzyme mit Bispezifität (z. B. MAP-Kinase-Kinasen) existieren⁵. Eine weitere Möglichkeit, Kinasen zu klassifizieren, ist die Unterscheidung nach ihrem Aktivierungsmechanismus. So ist beispielsweise die Proteinkinase A, ein Schlüsselenzym der β -adrenergen Signaltransduktion, eine cAMP-abhängige Proteinkinase⁶.

Das humane Genom kodiert für ca. 500 Kinasen (~400 Ser/Thr, ~90 Tyr, ~40 dualspezifische Kinasen)^{7,8}, was die biologische Bedeutung dieser Enzyme verdeutlicht, allerdings

auch eine strikte Regulierung der Kinaseaktivität nötig macht. Mehrere Mechanismen stehen innerhalb der Zelle für die Aktivierung von Kinasen zur Verfügung: (1) Die Bindung von sekundären Botenstoffen wie beispielsweise cAMP oder cGMP, (2) das Bereitstellen von Co-faktoren wie Ca^{2+} , IP_3 , (3) Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Kinase, (4) Lokalisationsänderung, (5) Aktivator-/Inhibitorproteine (PKI als Inhibitor für PKA), sowie (6) spezifische Substratinteraktionen, welche zum Teil selbst der Regulation durch Phosphorylierung unterliegen⁹⁻¹³. Es werden nicht wahllos Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Reste innerhalb eines Proteins phosphoryliert, vielmehr ist die Position der Phosphorylierung von sogenannten Konsensussequenzen abhängig. Konsensussequenzen sind die Phosphorylierungsstelle umgebende Primärsequenzen, welche zum Teil variabel und nicht Kinase-exklusiv sind. Die Proteinkinase A beispielsweise besitzt die optimale Konsensussequenz $\text{R-R-x}_1\text{-S/T-x}_2$, wobei auch $\text{R/K-R/K-x}_1\text{-S/T-x}_2$ mit abgeschwächter Präferenz genutzt wird. Ein Prolin an Position x_2 wird nicht toleriert, x ist ansonsten variabel, im Idealfall allerdings eine kleine, hydrophobe Aminosäure. Ein einzelnes Arginin an Position -2 oder -3 ist ebenfalls möglich ($\text{R-x}_1\text{-S/T-x}_2$; $\text{R-x}_2\text{-x}_1\text{-S/T-x}_2$), jedoch scheint dies eher ein bevorzugtes Motiv für andere basophile Kinasen (PKC, PAK1) zu sein. Folgende Einteilung nach absteigender Wahrscheinlichkeit kann bezüglich der PKA-Konsensussequenz getroffen werden: $\text{RRx}_1\text{S} > \text{RRx}_1\text{T}$, $\text{RKx}_1\text{S/T} > \text{KKx}_1\text{S/T}$, $\text{KRx}_1\text{S/T} > \text{Rx}_2\text{x}_1\text{S}$, Rx_1S ^{7,14-16}.

Phosphatasen katalysieren als Gegenspieler zu den Kinasen die Hydrolyse des Phosphorsäureesters. Neben den 500 Kinasen kodiert das humane Genom für ca. 200 Phosphatasen. Ebenso wie die Kinasen können die Phosphatasen in drei Gruppen eingeteilt werden, abhängig von der jeweiligen zu dephosphorylierenden Aminosäure: Ser/Thr-Phosphatasen, Tyr-Phosphatasen und dualspezifische Phosphatasen (~40 Ser/Thr, ~100 Tyr, ~50 dualspezifische Phosphatasen)^{7,17}. Die große Diskrepanz der 400 Ser/Thr-Kinasen und lediglich 40 Ser/Thr-Phosphatasen erfordert eine ausgeprägte Regulation und Spezifität dieser Phosphatasen. Diese Regulation erfolgt hauptsächlich über die Bindung der katalytischen Untereinheit an eine bestimmte regulatorische Untereinheit, wobei oft verschiedene regulatorische Untereinheiten zur Regulation einer katalytischen Untereinheit existieren⁷.

1.1.3 Die biologische Bedeutung der Phosphorylierung

Es wird vermutet, dass ein Drittel aller eukaryotischen Proteine durch Phosphorylierung modifiziert wird und diese posttranslationale Modifikation oft eine Schlüsselrolle in der Regulation des Proteins einnimmt¹⁸. Die Phosphorylierung kann als „Molekularer Schalter“ verstanden werden, der je nach Bedarf ein Protein aktiviert bzw. deaktiviert. Die Einführung eines geladenen Phosphatrestes induziert oft eine Konformationsänderung innerhalb eines Prote-

ins. Zuvor hydrophobe Teile werden in hydrophile, polare Abschnitte umgewandelt. Die Eigenschaft und Struktur eines Proteins verändert sich, oftmals mit Auswirkungen auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen. Dies kann wiederum Einfluss auf die Aktivität, Lokalisation sowie Stabilität des Proteins haben⁹. Die Zelle hat sich über diese posttranslationalen Modifikationen eine Möglichkeit geschaffen, ohne eine Veränderung in der Genexpression schnell und reversibel auf extrazelluläre Signale zu reagieren. Wie häufig diese Möglichkeit genutzt wird und wie wichtig sie ist, zeigen die zahlreichen Prozesse, in denen Phosphorylierung als Regulationsmechanismus beteiligt ist. Beispielsweise wird die Zellzyklusaktivität primär über Phosphorylierung gesteuert, aber auch in der Entwicklung, der Differenzierung, der Transformation, der Hormonsignaltransduktion und Adaption kommt der Phosphorylierung eine Schlüsselrolle innerhalb der Zelle zu^{9,18,19}.

Es ist nicht verwunderlich, dass viele Krankheiten mit einer fehlerhaften Regulation der Phosphorylierung/Dephosphorylierung in Zusammenhang stehen. Zahlreiche Kinasen (v.a. Tyrosinkinasen) werden als Protoonkogene in direkte Verbindung mit der Karzinogenese gebracht, wobei hier sowohl Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung, als auch Mutationen, die zur Inaktivierung der Kinase führen, eine Rolle spielen^{18,20}. Bei neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen steht ebenfalls ein verändertes Phosphorylierungsmuster der Zelle in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese²¹⁻²⁴. Dies verdeutlicht die klinische Relevanz der Phosphoanalytik nicht nur im Bereich der Diagnostik sondern auch in der Prävention und Behandlung von Krankheiten.

1.2 Die kardiale Signaltransduktion des β -adrenergen Systems

1.2.1 Die β -adrenergen Rezeptoren des Herzens

β -adrenerge Rezeptoren (β AR) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die zur Familie der adrenergen Rezeptoren (AR) gehören. Aktiviert werden diese durch die Überträgerstoffe Adrenalin und Noradrenalin, welche die sympathische Aktivität des vegetativen Nervensystems vermitteln²⁵. β -AR übernehmen somit eine zentrale Rolle in der sympathischen Signaltransduktion, was auch an ihrer vornehmlichen Expression in sympathisch innerviertem Gewebe zu erkennen ist.

Es sind drei Subtypen von β -adrenergen Rezeptoren bekannt, β_1 , β_2 , β_3 , welche alle im kardialen Gewebe nachgewiesen werden konnten^{26,27}. Während die Effekte der β_1 - und β_2 - Subtypen im Herzen gut untersucht sind, ist die Rolle des β_3 - Subtyps im Herzen noch weitgehend unklar. Nach β_3 -AR Aktivierung konnte eine negativ inotrope Wirkung beobach-

tet werden, die über eine $G\alpha_i$ -induzierte Ausschüttung von Stickoxid (NO) zustande kommt^{28,29}. Dieser nicht-klassische $G\alpha_i$ -Protein vermittelte Signalweg stellt möglicherweise durch die Herabsetzung der Kontraktilität einen Schutzmechanismus des Herzens gegen erhöhte adrenerge Stimulation dar³⁰ (Abb. 1). Sowohl der β_1 - als auch der β_2 - Subtyp koppeln an $G\alpha_s$, wobei für die β -adrenergen Effekte im Herzen überwiegend der β_1 -AR verantwortlich gemacht wird. Dies wird durch die vergleichsweise höhere Expression des β_1 -AR bedingt, welcher mit 75-80% aller β -AR der vorherrschende Subtyp im Herzen ist³¹.

Die Assoziation dieser Rezeptoren mit $G\alpha_s$ bewirkt über eine Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase (AC) eine Erhöhung des intrazellulären Spiegels von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA), welche maßgeblich die Effekte der β -adrenergen Signaltransduktion im Kardiomyozyten vermittelt³². Es kommt zu einer gesteigerten Muskelkontraktion (positiv inotrop), die Relaxationszeit in der Diastole nimmt ab (positiv lusitrop), die Herzfrequenz (positiv chronotrop) und die Überleitungsgeschwindigkeit im AV-Knoten (positiv dromotrop) nehmen zu³³.

Im Unterschied zum β_1 -adrenergen Rezeptor kann der β_2 -Subtyp neben $G\alpha_s$ auch an $G\alpha_i$ binden³⁴. Dies hat neben der proapoptotischen Wirkung $G\alpha_s$ -vermittelter Signaltransduktion einen zusätzlichen antiapoptotischen Effekt, welcher dominierend ist. Eine β_2 -AR Stimulation wirkt sich daher im Gegensatz zur β_1 -AR Aktivierung positiv auf das Überleben der Zellen aus^{35,36}.

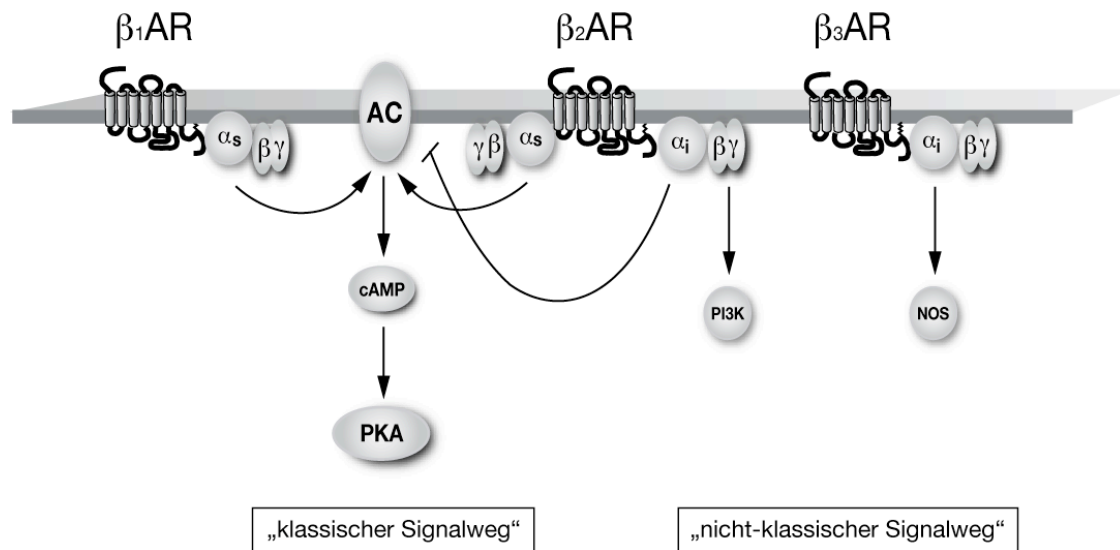


Abbildung 1: Übersicht über die β-adrenerge Rezeptorsubtypen-Kopplung und Signaltransduktion in der Herzmuskelzelle. Gezeigt ist der „klassische“ Gαs vermittelte Signalweg und die „nicht-klassische“, Gαi vermittelte Signaltransduktion. Modifiziert nach Ref.³⁷.

1.2.2 Die Auswirkung chronischer β-adrenerger Stimulation auf das Myokard

Während eine kurzfristige Aktivierung β-adrenerger Rezeptoren zu einer akuten Leistungssteigerung des Herzens führt, bewirkt eine dauerhafte Stimulation strukturelle, funktionelle und molekulare Veränderungen am Herzen. Chronische, catecholaminerge Stimulation des Myokards führt zum sogenannten „kardialen Remodelling“. Kennzeichnend hierfür ist eine Größenzunahme und ein Kontraktilitätsverlust des einzelnen Myozyten, einhergehend mit gesteigerter Nekrose und Apoptose. Auch die Extrazellulärmatrix des Herzens verändert sich, das interstitielle Bindegewebe nimmt zu, die passive Dehnbarkeit des Herzens wird geschwächt³⁸.

Auf Rezeptorebene treten im insuffizienten Herzen ebenfalls gravierende Veränderungen auf. Die Anzahl der β₁-adrenergen Rezeptoren ist reduziert³⁹, es kommt zu einer Entkopplung von β₁- und β₂-adrenergen Rezeptoren von G-Proteinen. Die Gαi-Proteinexpression ist erhöht, was eine Hemmung der AC-Aktivität und somit eine Reduktion der Gαs vermittelten Signaltransduktion vermuten lässt^{31,37,40,41}. Dieser als Anpassungsmechanismus an gesteigerte Volumen- und Druckbelastung dienende Prozess führt bei einer chronisch erhöhten sympathischen Aktivierung zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Leistungsfähigkeit des Herzens, bis hin zur Herzinsuffizienz. Maßgeblich beteiligt an der Pathophysiologie chronisch adrenerger Stimulation im Herzen ist der β₁-AR. Im transgenen Mausmodell führte

bereits eine 5- bis 15-fache kardiale β_1 -AR Überexpression zur Entwicklung von Hypertrophie, Fibrose und bereits bei jungen Mäusen zu Herzinsuffizienz⁴². Im Gegensatz dazu hatte eine 60-fache kardiale Überexpression des β_2 -AR keine pathologischen Konsequenzen im Mausmodell, stattdessen zeigten diese Mäuse eine gesteigerte kardiale Funktion. Lediglich sehr hohe Expressionslevel (100- bis 350-fache Überexpression) führten zu einer rapide fortschreitenden Kardiomyopathie, in der Pathologie vergleichbar mit exzessiver adrenerger Stimulation⁴³. Die Phänotypen dieser beiden Mausmodelle verdeutlichen klar die unterschiedliche Signaltransduktion der beiden Rezeptoren, was ebenfalls auf unterschiedliche Funktionen der Rezeptoren im Myokard schließen lässt.

1.2.3 Phosphorylierung als Modulator der kardialen Erregungs-Kontraktions-Kopplung (ECC)

Die sympathische Signaltransduktion wird innerhalb der Zelle über die zytosolische cAMP-Konzentration reguliert. cAMP ist ein sekundärer Botenstoff, dessen Aufgabe darin besteht, Signale von außerhalb der Zelle an intrazelluläre Effektorproteine weiterzuleiten⁴⁴. Ein $G_{\alpha s}$ vermittelter Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels aktiviert die Proteinkinase A (PKA), ein Schlüsselenzym in der β -adrenergen Signaltransduktion. In der Herzmuskelzelle phosphoryliert PKA zahlreiche Proteine, die unter anderem an der Erregungs-Kontraktions-Kopplung (ECC) beteiligt sind. Die PKA ist der Hauptvermittler der sympathischen Regulation der ECC, einem Prozess, in dem ein Aktionspotenzial die Kontraktion der Muskelzelle auslöst.

Beispiele prominenter PKA-kontrollierter Substratproteine der ECC sind der spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanal (Cav1.2), der Ryanodin-Rezeptor (RyR), Troponin I (TnI), das Myosin-bindende Protein C (MyBP-C) und Phospholamban (PLN)⁴⁵ (Abb. 2).

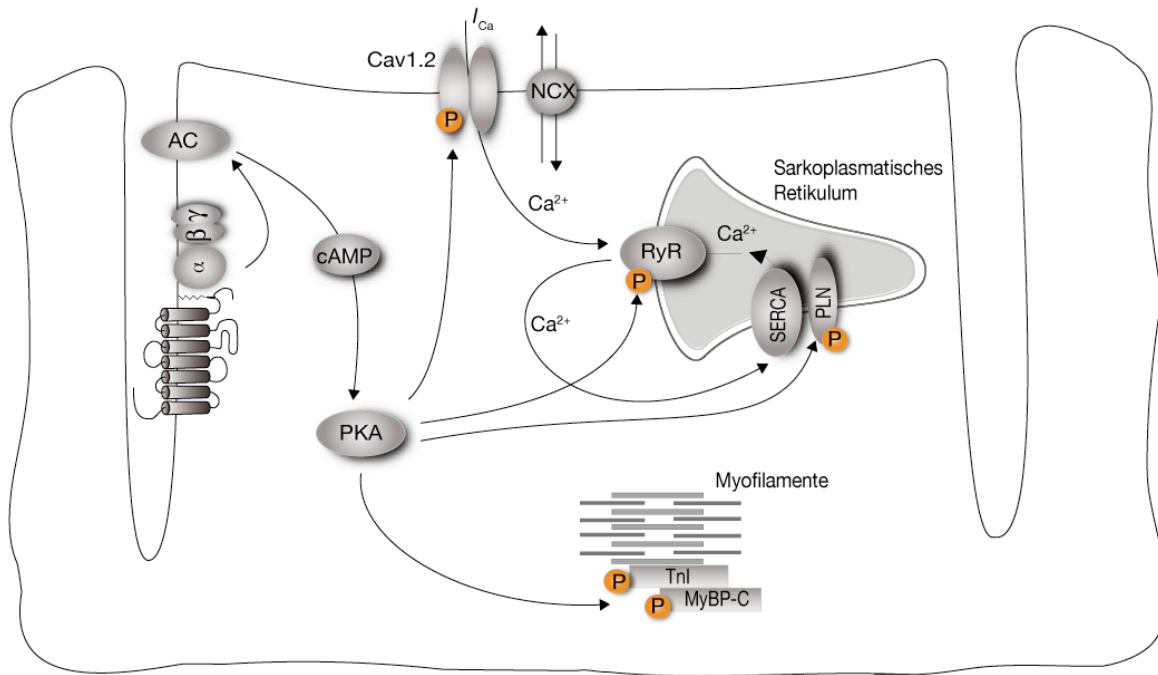


Abbildung 2: Übersicht über bekannte PKA-regulierte Proteine in der kardialen Erregungs-Kontraktions-Koppelung (ECC). Modifiziert nach Ref.³⁷.

Nach β -adrenerger Stimulation wird durch die Phosphorylierung des sarcolemmal lokalisierten Cav1.2 der einwärtsgerichtete Calciumstrom (I_{Ca}) verstärkt, es fließt vermehrt extrazelluläres Ca^{2+} in das Zellinnere. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird vom RyR, einem im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisierten Calciumkanal, detektiert. Dadurch wird ein positiver Rückkopplungs-Mechanismus ausgelöst, der zu einer gesteigerten Freisetzung von Calcium aus dem SR ins Zytosol führt^{46,47}.

Der RyR wird ebenfalls durch die PKA phosphoryliert, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals gesteigert wird^{46,48,49}. Die Phosphorylierung dieser beiden Proteine erhöht die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, es steht mehr freies Ca^{2+} für die systolische Kontraktion zur Verfügung. Hierauf basiert die positiv inotrope Wirkung der β -adrenergen Stimulation.

Die positive lusitrope Wirkung hingegen wird über die Phosphorylierung von TnI, MyBP-C und PLN vermittelt^{50,51}. TnI reguliert die Ca^{2+} -Sensitivität von Myofilamenten, indem es im phosphorylierten Zustand die Ca^{2+} -Affinität der Troponin C-Untereinheit des Troponin-Proteinkomplexes herabsetzt^{51,52}. MyBP-C beeinflusst phosphorylierungsabhängig die Aktin-Myosin-Wechselwirkung und somit die Motoraktivität des Muskels^{53,54}. Zusätzlich wird über die Phosphorylierung von PLN der Rücktransport von Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in SR gesteuert. Im dephosphorylierten Zustand hemmt PLN die im SR lokalisierte sarkoplasmatische/endoplasmatische Calcium-ATPase (SERCA), welche den Rücktransport von zy-

tosolischem Calcium ins SR vermittelt⁵⁵. Nach Phosphorylierung wird die hemmende Wirkung aufgehoben, es kommt zu einem effizienteren Rücktransport der Ca^{2+} -Ionen in das SR und zur Beendigung der Kontraktion.

Die PKA-vermittelte Phosphorylierung zahlreicher, an der ECC beteiligter Proteine kann somit nicht nur eine bestehende Kontraktion verstärken, sondern auch die Relaxationsfähigkeit, den mechanischen Gegensatz zur Kontraktion, beschleunigen. Die physiologische sympathische Stimulation des Herzens bewirkt auf diese Weise phosphorylierungsabhängig eine gesteigerte Herzleistung.

1.3 Die Analytik der Proteinphosphorylierung

Die Analyse zellulärer Phosphorylierungsmuster besitzt, wie bereits erwähnt, nicht nur im Hinblick auf ein besseres Verständnis komplexer zellulärer Vorgänge biologische Bedeutung, sondern auch in hohem Maße klinische Relevanz. Obwohl schon länger im Fokus der biochemischen Forschung, ist die Analyse der Phosphorylierung immer noch eine Herausforderung. Ein Problem stellt die Tatsache dar, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt nur ein kleiner Teil des zellulären Proteoms in phosphorylierter Form vorliegt⁵⁶. Erschwerend kommt hinzu, dass gerade phosphorylierte Signalproteine oft relativ niedrig-abundante Proteine sind³. Außerdem kann das Phosphorylierungsmuster eines Proteins heterogen sein, das heißt, es existiert in mehreren verschiedenen phosphorylierten Formen. Während abundante Phosphorylierungsstellen oft einfach zu detektieren sind, können weniger häufig phosphorylierte Aminosäurereste leicht übersehen werden. Obwohl es mittlerweile ein breites Spektrum kommerziell erhältlicher Phosphataseinhibitoren gibt, kann außerdem die Gefahr der Dephosphorylierung durch endogene Phosphatasen während der Probenvorbereitung nie ganz ausgeschlossen werden^{1,2}.

Die *in vitro* Untersuchung der Phosphorylierung vermag nur bedingt die momentanen zellulären Sachverhalte widerzuspiegeln, da Kinasen im nicht-zellulären Kontext oft zu unspezifischer Phosphorylierung neigen. In den vergangenen Jahren hat sich die Massenspektrometrie als Methode der Wahl zur Untersuchung von Phosphorylierung speziell unter *in vivo* Bedingungen etabliert. Die Gründe hierfür sind unter anderem die hohe Massengenauigkeit und Sensitivität der Massenspektrometrie. Bereits Konzentrationen im Femtomol-Bereich können im Massenspektrometer detektiert werden. Zudem lässt sich in einem automatisierten Verfahren die exakte Position der Phosphorylierungsstelle bestimmen⁵⁷.

Abbildung 3 zeigt ein allgemeines Schema für eine massenspektrometrische Analyse phosphorylierter Proteine. Der Analyse geht in der Regel der Verdau der isolierten Proteine

voran. Vor der Messung sollten die phosphorylierten Peptide aus der komplexen Peptidmischung isoliert werden, wofür chromatographie- oder affinitätsbasierte Anreicherungsverfahren zur Verfügung stehen. Die hohe Sensitivität und Massengenauigkeit der Massenspektrometrie ermöglicht anschließend die Analyse modifizierter (z. B. phosphorylierter) Reste¹. Der Proteindatenbankabgleich identifiziert letztendlich die detektierten Phosphorylierungsstellen⁵⁸⁻⁶¹.

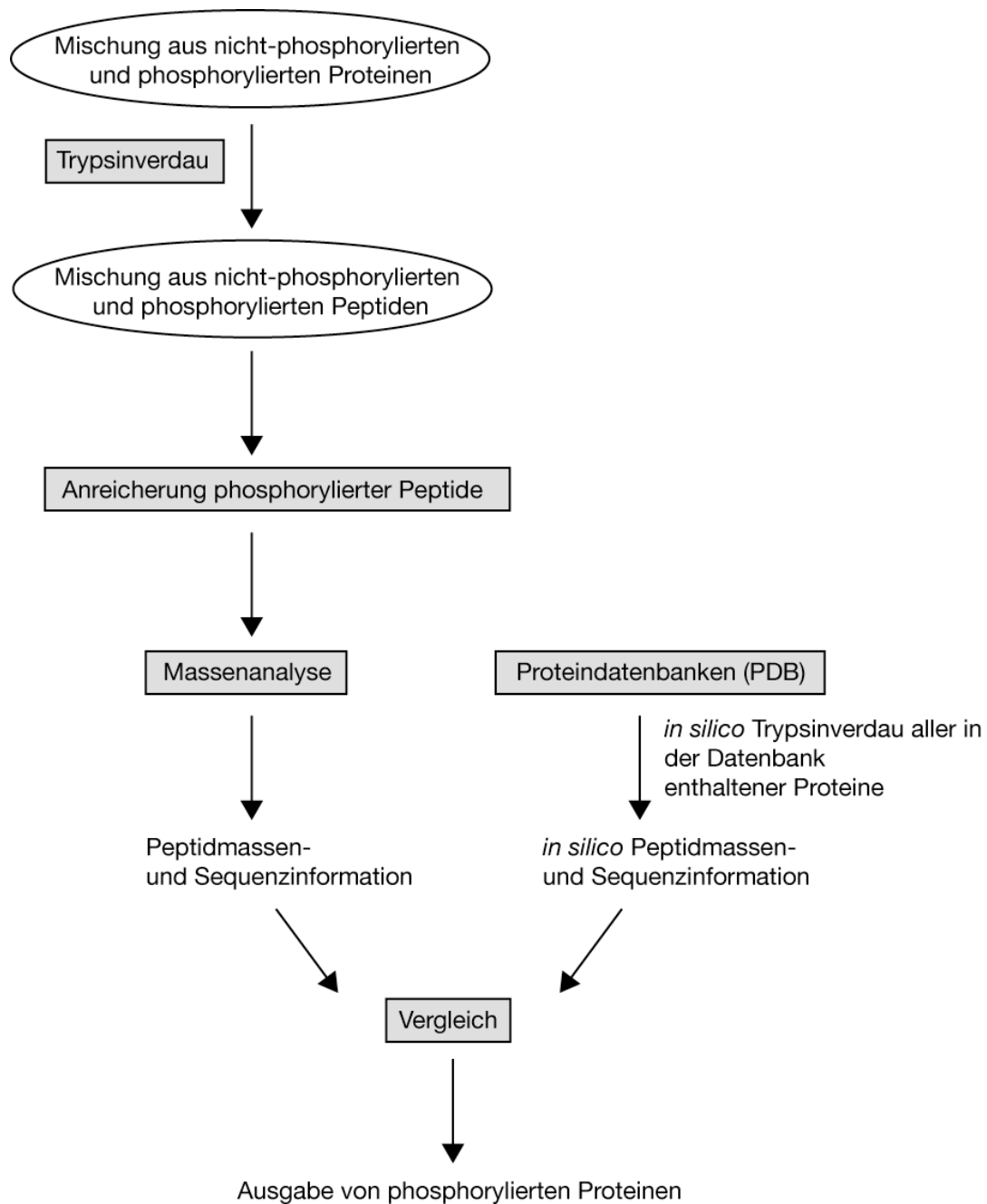


Abbildung 3: Schema zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in Proteinen mittels Massenspektrometrie.

1.3.1 Trypsinverdau

Die Identifizierung phosphorylierter Proteine kann entweder auf Proteinebene („*top down*“) oder, wie im Bereich der MS-Proteomik üblich, im sogenannten „*bottom up*“-Ansatz auf Ebene des Peptids erfolgen. Bei letzterer Vorgehensweise werden die Proteine proteolytisch in Peptide bestimmter Länge gespalten, Masse und Sequenz werden nachfolgend im Massenspektrometer bestimmt. Das Enzym der Wahl ist in der Regel Trypsin. Trypsin schneidet C-terminal von den basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R), ausgenommen ein Prolin (Pro) folgt an Position +1. Dadurch enthalten alle Peptide automatisch eine basische Aminosäure am C-Terminus, was die nachfolgende, in der Proteinanalytik meist übliche positive Ionisierung der Peptide erleichtert¹.

1.3.2 Anreicherung phosphorylierter Peptide

Phosphoproteine stehen in der Zelle in einem ständigen Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung, wobei der Anteil des nicht-phosphorylierten Proteins in der Regel überwiegt. Der tryptische Verdau enthält somit nur eine geringe Fraktion phosphorylierter Peptide. Zudem lassen sich phosphorylierte Peptide schlechter ionisieren verglichen mit nicht-phosphorylierten Peptiden, was in Anwesenheit nicht-phosphorylierter Peptide eine Signalabschwächung (Ionensuppressions-Phänomen) bedingt. Eine verlässliche qualitative Analyse dieser Phosphopeptide wäre in einem Gesamtverdau trotz der mittlerweile sehr spezifischen Scan-Verfahren für Phosphopeptide nicht möglich. Eine der Analyse vorangehende Anreicherung der Phosphopeptide ist somit unerlässlich^{62,63}.

Es existieren eine Vielzahl von Strategien zur Anreicherung von Phosphopeptiden, die sich vor allem den niedrigen pKs-Wert und die sterische Struktur der Phosphatgruppe zu Nutze machen⁵⁶. Neben chromatographischen Verfahren werden verstärkt affinitätsbasierte Anreicherungsstrategien zur Isolation von Phosphopeptiden verwendet. In den letzten Jahren haben sich vor allem zwei affinitätsbasierte Verfahren zur Anreicherung phosphorylierter Peptide etabliert: (A) Die immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) und (B) die Anreicherung über Metalloxide.

(A) Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC): Ursprünglich zur Anreicherung von Proteinen entwickelt⁶⁴, wird IMAC mittlerweile als gängige Methode zur Isolation von Phosphopeptiden aus komplexen proteolytischen Gemischen genutzt. Die negativ geladene Phosphatgruppe wird über elektrostatische Wechselwirkungen an die positiv geladene stationäre IMAC-Phase gebunden⁶⁵ (Abb. 4).

Die stationäre IMAC-Phase besteht in der Regel aus einem Chelatkomplex von Iminodisessigsäure (IDA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) als Chelator und einem dreifach-positiv geladenen Metallion (z.B. Fe^{3+} , Ga^{3+}) als Zentralatom^{66, 67}, gekoppelt an ein Trägermaterial (Agarose, Polymere).

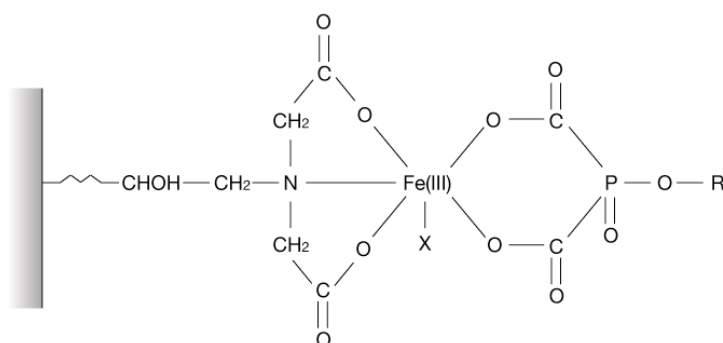


Abbildung 4: Bindungsmodell des immobilisierten Eisen-(III)-Ions der stationären IMAC-Phase und der Phosphatgruppe. X kann z. B. Wasser oder OH^- sein. R repräsentiert einen organischen Rest. Modifiziert nach Ref.⁶⁵.

Histidin-reiche Peptide (Elektronen-Donoren) und nicht-phosphorylierte, stark saure Peptide können ebenfalls an die positiven Metallionen der stationären Phase binden. Eine Möglichkeit, die Bindung saurer Peptide an die stationäre Phase zu vermeiden, ist die vorangehende Veresterung der Säuregruppe⁶⁸. Die Esterifizierung der Carboxygruppen ist jedoch neben möglichen ungewollten Nebenreaktionen mit Materialverlust verbunden und erfolgt zudem nicht quantitativ. Dies führt zu einem Anstieg der Probenkomplexität, was wiederum negative Auswirkungen auf die Sensitivität der Analyse zur Folge haben kann⁶⁶.

Generell sollte die Bindung der Phosphopeptide an die stationäre Phase bei $\text{pH} < 1,9$ stattfinden, da der pK_s -Wert der Phosphorsäure in Verbindung mit den im Ladepuffer enthaltenen organischen Resten auf bis zu $\text{pK}_s = 1,1$ erniedrigt wird. Während organische Säuren bei $\text{pH} 1,9$ weitgehend protoniert und somit neutral vorliegen, können die ionischen Phosphate spezifisch binden. Es wurde gezeigt, dass der Zusatz von Acetonitril (MeCN) zum Ladepuffer diese pK_s -Wert-Differenz noch weiter erhöhen kann^{69,70}. Die Elution der phosphorylierten Peptide erfolgt in der Regel unter alkalischen Bedingungen (Ammoniumwasser $\text{pH} = 10$), allerdings finden auch Komplexbildner wie EDTA, stark saure Lösungen ($\text{pH} < 1$) oder Phosphorsäure-Lösungen Verwendung (Abb. 5).

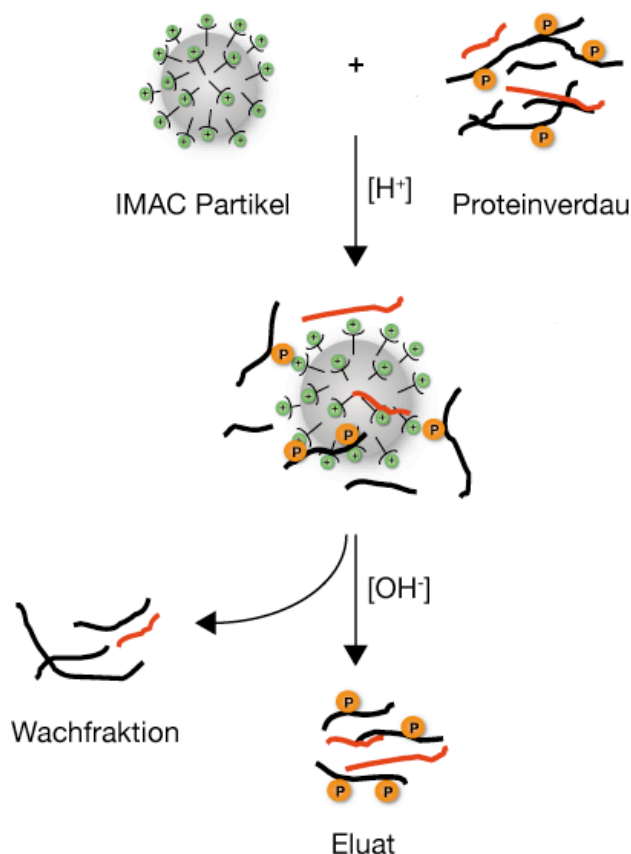


Abbildung 5: IMAC-Anreicherung:

(Oben + Mitte) Die IMAC-Partikel werden unter sauren Bedingungen mit dem tryptischen Peptidgemisch inkubiert. Neben den phosphorylierten Peptiden können auch stark saure Peptide (in rot dargestellt) an die positiv geladenen Oberflächen der IMAC-Partikel binden.

(Unten) Nach Waschen der IMAC-Partikel erfolgt die Elution der phosphorylierten Peptide unter basischen Bedingungen.

(B) Metalloxid Affinitätschromatographie (MOAC): Eine Alternative zur IMAC ist die Anreicherung phosphorylierter Peptide mittels Metalloxiden⁷¹, eine Affinitätsanreicherung die, verglichen mit IMAC, eine höhere Kapazität und Spezifität zur Phosphatgruppe aufweist¹. Neben Metalldioxyden wie Zirkoniumdioxid (ZrO_2) und Aluminiumhydroxid ($Al(OH)_3$) hat sich vor allem die Verwendung von Titandioxid (TiO_2) durchgesetzt. Die Phosphatgruppe bildet mit TiO_2 einen bidentaten Oberflächenkomplex mit einer Bindestöchiometrie von 1:2. Substituierte, aromatische Säuren adsorbieren ebenfalls mit vergleichbarer Affinität wie Phosphate an die TiO_2 -Oberfläche, allerdings in einem 1:1 Bindungsverhältnis^{62,71} (Abb. 6).

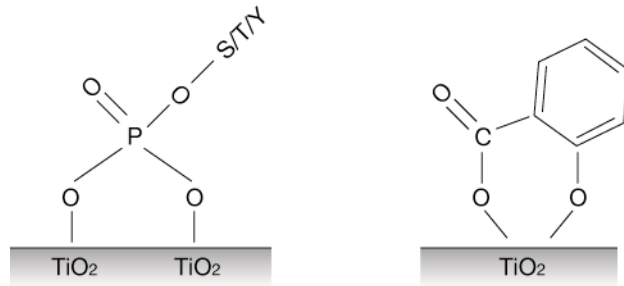


Abbildung 6: Bindungsmodell der Phosphatgruppe und Salicylsäure an die Oberfläche von TiO_2 -Partikeln. Während die Phosphatgruppe einen bidentaten Brückenkomplex mit TiO_2 eingeht, bindet die Salicylsäure als bidentater Chelatkomplex. Abb. modifiziert nach Ref.⁶².

Dieser unterschiedliche Bindungsmodus dürfte für die geringe Effektivität des Zusatzes von Phosphat zur Bindungsprävention von nicht-phosphorylierten Peptiden an TiO_2 verantwortlich sein⁶². Im Gegenzug konnte gezeigt werden, dass besonders substituierte, aromatische Säuren die Adsorption nicht-phosphorylierter Peptide an die TiO_2 -Oberfläche verhindern. Durch den Ladepufferzusatz dieser organischen Säuren (Phthalsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)) zur kompetitiven Verdrängung, insbesondere nicht-phosphorylierter saurer Peptide, kann die Spezifität der TiO_2 -Anreicherung erheblich gesteigert werden⁶². Ähnlich zur IMAC-Anreicherung erfolgt die Bindung phosphorylierter Peptide unter sauren Bedingungen, die nachfolgende Elution wird im Basischen (Ammoniumwasser $\text{pH}=10$) durchgeführt.

1.3.3 Die massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierung

Während klassische Ansätze wie radioaktive [^{32}P]-Markierung, der Edman-Abbau oder phosphorylierungsspezifische Immunodetektion in der Regel nur für die Analyse einer oder weniger Phosphorylierungsstellen verwendet werden, ermöglicht die Massenspektrometrie die Untersuchung ganzer zellulärer Phosphorylierungsmuster und die Entdeckung bislang unbekannter Phosphorylierungsstellen. Nicht nur die exakte Position der Phosphorylierung kann bestimmt werden, neuere massenspektrometrische Methoden erlauben auch die relative Quantifizierung der Phosphorylierung.

Prinzipiell wird bei der Detektion phosphorylierter Peptide der Umstand ausgenutzt, dass jeder phosphorylierte Rest eine Massendifferenz von +79,97 Da bewirkt⁷⁹ (Abb. 7). Dieser Massenunterschied kann im MS nachgewiesen werden, vorausgesetzt die Phosphorylierung bleibt während der Probenaufarbeitung und Elektronenspray-Ionisation (ESI) erhalten⁶⁶.

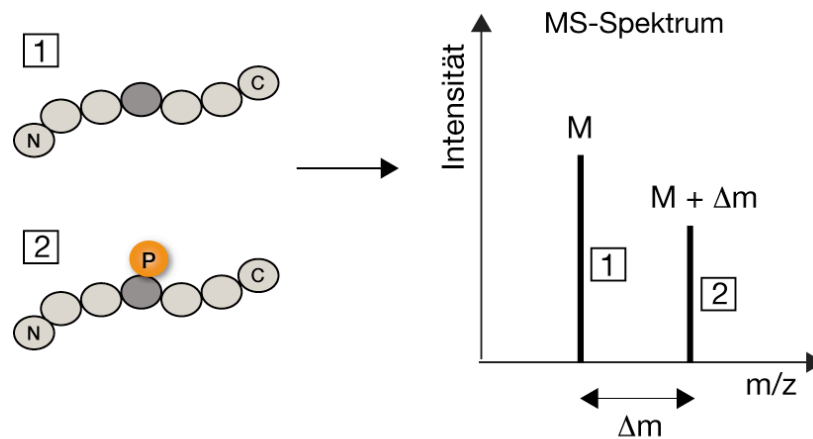


Abbildung 7: Schematisches MS-Spektrum eines Peptides mit dem Masse zu Ladungsverhältnis M in nicht-phosphorylierter und phosphorylierter Form. Δm repräsentiert die Differenz des Masse zu Ladungsverhältnisses (m/z), hervorgerufen durch die Phosphorylierung. Modifiziert nach Ref.⁶⁶.

In der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) kann über das spezifische Fragmentierungsmuster des Vorläuferions nicht nur die Sequenz eines Peptides, sondern auch die Position eines modifizierten Restes bestimmt werden.

1.3.3.1 Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS)

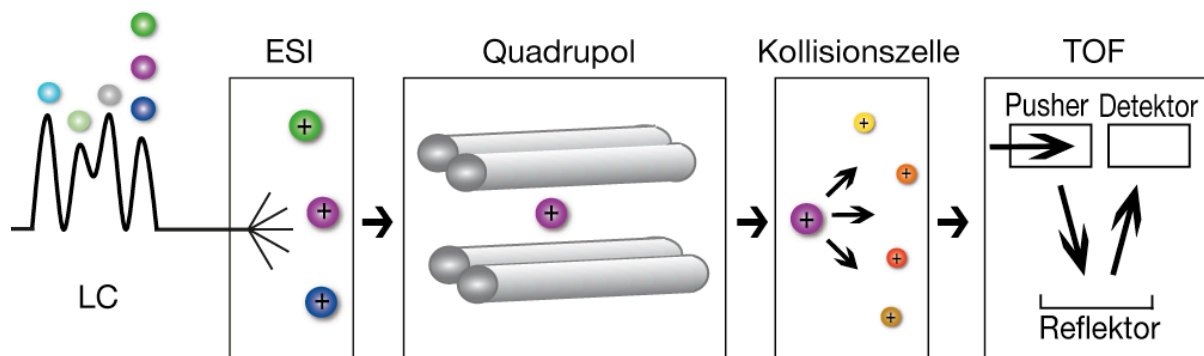


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Flugzeitanalysator Hybrid-Tandem-Massenspektrometers, das an einen Flüssigchromatographen (LC) gekoppelt ist (LC-MS/MS). Durch Elektrospray-Ionisation (ESI) werden die zuvor chromatographisch aufgetrennten Peptide vor Eintritt in das Massenspektrometer ionisiert.

Für komplexe Proben wird der massenspektrometrischen Analyse oft ein Probentrennverfahren vorgeschaltet. Häufig findet eine Verbindung aus Flüssigchromatographie mit direkter Kopplung an ein Massenspektrometer (LC-MS/MS) Verwendung. Diese vorgeschaltete chromatographische Auftrennung der Peptide reduziert die Komplexität der Probe, was wiederum die Nachweisgrenze erheblich senken kann⁶⁶.

Die Peptide werden in der LC-MS/MS im Flüssigchromatographen über eine C18-Umkehrphase gemäß ihrer hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufgetrennt. Die aufgetrennten Peptide werden über eine Gradientenelution direkt in das Massenspektrometer eluiert, ionisiert und massenspektrometrisch analysiert. Ein Tandem-Massenspektrometer besteht in der Regel aus zwei hintereinandergeschalteten Analysatoren mit einer dazwischen eingebauten Kollisionszelle. Die Analysatoren können vom selben, aber auch unterschiedlichen Typus sein, ein sogenanntes Hybrid-System. Oft verwendete Kombinationen bestehen aus zwei Quadrupolen oder einem Quadrupol und einem Flugzeitanalysator (TOF)⁷³.

Die LC-MS/MS hat im Bereich der Bioanalytik besonders in der Struktur- und Sequenzanalyse von Peptiden Bedeutung erlangt. In dieser Arbeit wurde ein in Abbildung 8 schematisch dargestellter Aufbau genutzt. Zur Sequenzanalyse von Peptiden werden im MS-Modus Übersichts-Scans der m/z -Verhältnisse der Mutterionen durchgeführt, wobei die intensivsten Mutterionen für eine anschließende MS/MS-Analyse ausgewählt werden. Diese vorselektierten Mutterionen werden über den ersten Quadrupol Q1 aus dem Ionenstrahl in die Stoßkammer (=Kollisionszelle) übertragen. Es erfolgt eine Fragmentierung der Vorläuferionen durch kollisionsinduzierte Zerfälle (CID), d. h. durch niedrigerenergetische Kollision der Ionen mit einem inerten Gas (in der Regel Helium, Stickstoff oder Argon). Diese Kollision induziert spezifische Bindungsbrüche innerhalb des Peptids, woraus sogenannte Produktionen (Tochterionen) resultieren. Das m/z Verhältnis der Produktionen wird anschließend im dritten Analysator analysiert. Im MS/MS-Spektrum werden alle auftretenden Fragmentationen eines Vorläuferions gemäß ihrer m/z Verhältnisse nach relativer Intensität dargestellt, woraus sich aufgrund der resultierenden Massen- und Intensitätsunterschiede der einzelnen Fragmentationen die Peptidsequenz bestimmen lässt⁷³.

O-Phosphate zeigen aufgrund der schwachen Esterbindung unter den Bedingungen der CID spezifische Neutralverluste. pSer und pThr neigen zur Abspaltung von Phosphorsäure (H_3PO_4), in geringerem, vernachlässigbarem Maße zur Abspaltung von meta-Phosphorsäure (HPO_3 ; pSer, pThr und pTyr). Diese Neutralverluste von 98 Da ($-\text{H}_3\text{PO}_4$) (80 Da ($-\text{HPO}_3$), vernachlässigbar) erzeugen charakteristische Markerionen, die mit hoher Intensität im MS/MS-Spektrum auftreten. Diese zusätzlichen Fragmente führen zu einem unübersichtlicheren MS/MS-Spektrum und zur Intensitätsunterdrückung der restlichen Fragmente^{2,74,75} (Abb. 9).

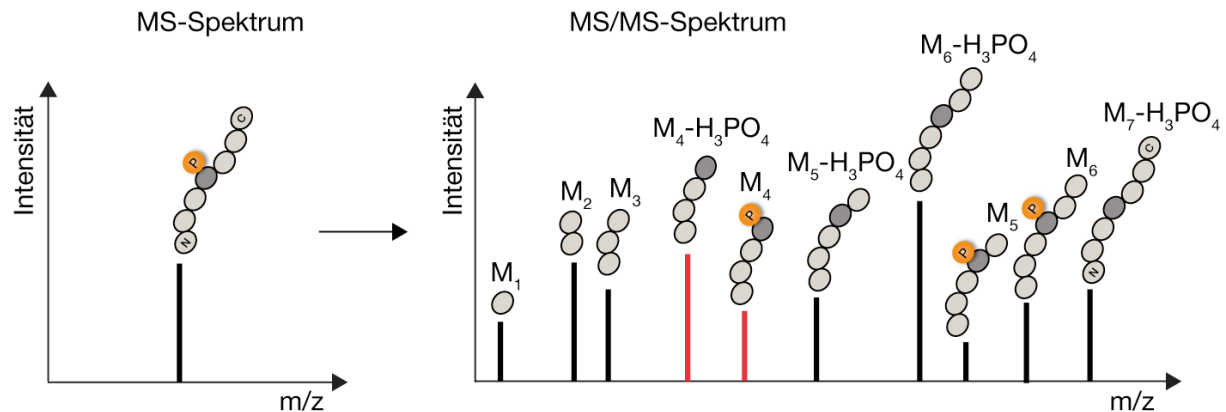


Abbildung 9: Schema eines MS- und MS/MS-Spektrums eines Phosphopeptids. Die Fragmentionen (M_{1-6}) zeigen oberhalb M_3 eine durch den Phosphatrest hervorgerufene erhöhte Masse im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Peptid. Neben den üblichen Fragmentionen (M_{1-6}) zeigt das Spektrum zudem durch Neutralverlust entstandenen Markerionen ($M_{4,5,6,7}-H_3PO_4$). Die rot markierten Signale demonstrieren die Fragmentationen, wodurch die Position der Phosphorylierung eindeutig zu bestimmen ist. Modifiziert nach Ref.⁶⁶.

1.3.3.2 Die Fragmentierung von Peptiden

Der niedrigerenergetische kollisionsinduzierte Zerfall (CID) erzeugt sequenzspezifische Fragmente, die einer definierten Nomenklatur unterliegen⁷⁶.

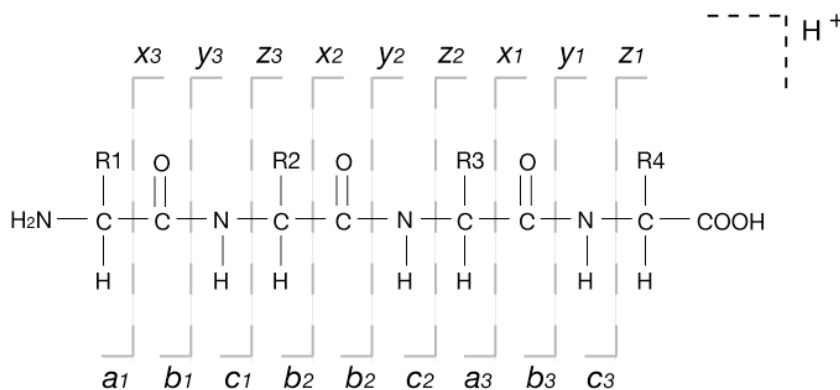


Abbildung 10: Übersicht über die möglichen Typen von Fragmentationen. Verbleibt die Ladung am N-Terminus des Fragments, entstehen a-, b- oder c-Ionen. C-terminal geladene Fragmentationen werden als x-, y- und z-Ionen bezeichnet⁷⁶.

Die primäre Spaltung der Peptide erfolgt im niedrigerenergetischen CID entlang der Peptidbindung, weshalb in erster Linie b-Typ-Ionen- und y-Typ-Ionen-Serien im MS/MS-Spektrum beobachtet werden können (Abb. 10). Die Spaltung von mehr als einer Bindung kann in selteneren Fällen auch interne Fragmente hervorrufen. Weitere Neutralverluste wie Wasser (-18 Da)- oder Ammoniakabspaltung (-17 Da) führen häufig zur Bildung von b° - und y° - bzw. b^* - und y^* -Ionen (http://www.matrixscience.com/help/fragmentation_help.html).

1.3.4 Datenbanksuche und Spektreninterpretation

Die Identifizierung von Proteinen anhand von MS/MS-Spektren erfolgt über einen automatisierten Datenbankvergleich. Die komplette Entschlüsselung des Genoms eines Organismus ermöglicht in Kombination mit theoretischen „*open reading frames*“ (ORF) das theoretische Proteom dieses Organismus vorherzusagen. Durch einen *in silico* Proteom-Verdau und die *in silico* Fragmentierung dieses theoretischen Proteoms kann anschließend über Suchalgorithmen der Vergleich mit den experimentellen MS- und MS/MS-Daten durchgeführt werden. Aus diesem Vergleich kann über die Identität eines Peptids das entsprechende Protein ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurde die Proteinsequenzdatenbank Swiss-Prot und der Suchalgorithmus Mascot⁷⁷ verwendet. Das tatsächlich gemessene MS/MS-Spektrum wird mit dem theoretisch berechneten MS/MS-Spektrum verglichen und die Ähnlichkeit über den „Mascot-Score“ bewertet. Ab einem bestimmten Schwellenwert dieses Scores („*threshold score*“, in der Regel $P < 0,05$) entspricht die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses 5%. Nur Peptididentifikationen mit einem Score oberhalb dieses Schwellenwertes sollten genutzt werden.

Posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung werden bei der Datenbanksuche als variable Modifikation behandelt, wobei jedes Ser, Thr, Tyr als potenziell mögliche Phosphorylierungsstelle betrachtet wird (<http://www.matrixscience.com>). Dieses zusätzliche, variable Suchkriterium erhöht die Anzahl möglicher Übereinstimmungen und somit auch die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse. Gerade im Bereich der „*large scale*“-Analysen posttranslationaler Modifikationen stellt die falsche Annotation von Peptiden und die Lokalisation der posttranslationalen Modifikation ein Problem dar. Um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse, das heißt falsch annotierter Peptide und Phosphorylierungsstellen, möglichst gering zu halten, ist besonders bei der Analyse phosphorylierter Peptide eine manuelle Evaluierung der Spektren sehr wichtig. Generell ist ein gutes MS/MS-Spektrum durch ein starkes Peaksignal mit einem guten S/N-Verhältnis gekennzeichnet. Die Fragmente sollten gleichmäßig über den gesamten m/z-Bereich des Spektrums verteilt sein, wobei die Fragmentintensität folgende Reihenfolge aufweisen sollte: $y > b > a$. Die dominierenden y- und b-Ionen sollten in hoher Zahl, möglichst als Serie, und gerade im Bereich der phosphorylierten Aminosäure vorhanden sein. Ionen mit Prolin am C-Terminus entstehen bevorzugt in der Fragmentierung, weshalb diese xxx-Prolin-Ionen in der Regel ein charakteristisches, starkes Signal aufweisen. Oft sind prominente, nicht annotierte Signale im Spektrum zu sehen, die zum Teil auf Neutralverluste oder interne Fragmente zu-

rückzuführen sind. Für diese nicht-annotierten Signale bedarf es der manuellen Zuordnung der Fragmente. Hierbei können Programme (z.B. Proteinprospector, <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) für eine virtuelle *in silico* Peptidfragmentierung genutzt werden. Durch die manuelle Kontrolle erfolgt demnach der zusätzliche Ausschluss von Spektren mäßiger Qualität sowie falsch annotierter posttranslationaler Modifikationen, was die Qualität der Ergebnisse erhöht.

1.3.5 Relative Quantifizierung der Phosphorylierung mittels *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)

Häufig werden in der Massenspektrometrie Massenspektrometer verwendet, die aus drei hintereinandergeschalteten Quadrupol-Einheiten, sogenannte Triple-Quadrupol (tQuad)-Analysatoren, bestehen⁷⁸ (Abb. 11). Dieser Aufbau ermöglicht verschiedene MS/MS-Scan-Methoden, bei denen Quadrupol 1 (Q_1) und Quadrupol 3 (Q_3) entweder auf den gesamten Massenbereich oder auf ein konstantes m/z Verhältnis eingestellt sind⁶⁷. Eine dieser Scan-Techniken ist das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), eine Methode welche die relative Quantifizierung der Phosphorylierung erlaubt. Diese Methode ist besonders für den Vergleich biologischer Zustände geeignet, beispielsweise der Veränderung des Phosphorylierungsmusters zweier unterschiedlich behandelter biologischer Proben⁷⁹.

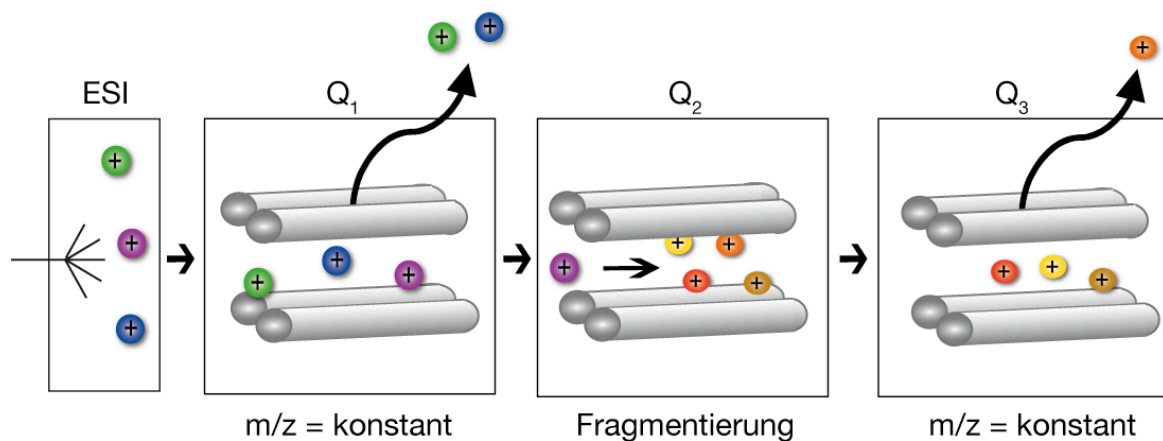


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers beim *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Während Quadrupol 1 (Q_1) nur spezifische Vorläuferionen in die Stoßkammer (Quadrupol 2 (Q_2)) überführt, lässt Quadrupol 3 (Q_3) nur spezifische Fragmentionen zum Detektor.

Beim MRM-Scan ist sowohl Q_1 als auch Q_3 auf ein konstantes Massenverhältnis m/z eingestellt. Nur bestimmte m/z -Verhältnisse von Vorläuferion und Fragmention können Q_1 (Massenfilter für das Vorläuferion) und Q_3 (Massenfilter für das Fragmention) passieren. Diese vordefinierten Paare aus Vorläuferionen-Masse und zugehöriger Fragmentenionen-Masse

werden als Übergänge bezeichnet⁶⁷. Die m/z -Massen der Übergänge können bereits vorhandenen MS/MS-Spektren entnommen werden. Eine andere Möglichkeit der Übergangsbestimmung ist der *in silico* Verdau und die *in silico* Fragmentierung von Proteinen. Zur genauen Definition eines Peptides empfiehlt es sich, drei bis fünf Übergänge zu bestimmen, welche im Idealfall von Fragmentionen-Massen mit möglichst intensiven Signalen im MS/MS-Spektrum stammen. Falls posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung untersucht werden, sollten die Übergänge neben prominenten Fragmentionenmassen in erster Linie m/z -Massen von Fragmentionen enthalten, welche die Position der modifizierten Aminosäure genau beschreiben. Als Ergebnis eines MRM-Scans werden sogenannte Ionenspur erhalten, aus denen die Fläche der Übergänge bestimmt wird (Abb. 12). Ein Vergleich der Flächen gleicher Übergänge verschiedener Proben ermöglicht die relative Quantifizierung eines bestimmten Peptides.

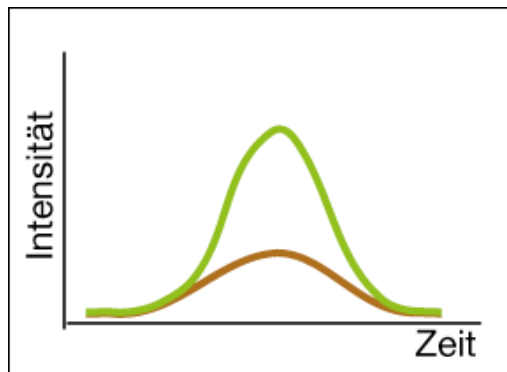


Abbildung 12: Schema zweier Ionenspur des gleichen MRM-Übergangs. Über den Vergleich der Flächen unter der Kurve zweier gleicher Übergänge aus unterschiedlichen Proben kann das dem Übergang entsprechende Peptid relativ quantifiziert werden.

Da im MRM-Scan nur bestimmte ausgewählte Peptide analysiert werden, können andere Peptidsignale ausgeblendet werden. Dies verleiht der MRM-Scan-Methodik eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität⁸⁰. Übergänge aus komplexen Proben können auch ohne vorangegangene Peptidauftrennung analysiert werden, selbst niedrig abundante Peptide können verlässlich identifiziert werden. Da allerdings die zu analysierenden Übergänge zuvor definiert werden müssen, besteht die Limitierung der MRM Scan-Methode in der Analyse bislang unbekannter, vor allem modifizierter Peptide. Zwar kann durch *in silico* Übergangsbestimmung nach unbekannten, hypothetischen Peptidmodifikationen gesucht werden, allerdings sollte in diesem Fall wenigstens die Proteinzusammensetzung der Probe bekannt sein.

1.4 Zielsetzung

Es wird angenommen, dass 30% aller zellulären Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt phosphoryliert in der Zelle vorliegen. Gegenwärtig sind jedoch lediglich etwa tausend Phosphoproteine identifiziert, was in großer Diskrepanz zu dieser Vermutung steht⁶³. Die Phosphorylierung nimmt eine Schlüsselfunktion in der zellulären Signaltransduktion ein. Im Herzen unterliegen zahlreiche sowohl kurzfristig als auch langfristig ablaufende zelluläre Prozesse der Modulation durch Phosphorylierung, was in engem Zusammenhang mit der Aktivität der β AR steht⁴⁵. Im Moment ist lediglich ein kleiner Teil der β -adrenergen Zielproteine bekannt und im Hinblick auf Phosphorylierung näher charakterisiert worden. Zum vollständigen Verständnis der komplexen β -adrenergen Regulation kardialer Funktion, insbesondere in Anbetracht der Pathologie chronischer adrenerger Stimulation bedarf es der Identifikation weiterer β -adrenerg regulierter Phosphoproteine.

Ziel der Arbeit war es, das kardiale Phosphoproteom adulter Mausherzen zu charakterisieren, mit besonderem Fokus auf β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstellen. Zu diesem Zweck sollte eine massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierung in Mausherzen zum einen unter β -adrenerger Stimulation, zum anderen nach Inhibition der β -adrenergen Rezeptoren durchgeführt werden. Über den direkten Vergleich beider Phosphorylierungsmuster sollten neue, bislang unbekannte β -adrenerg regulierte Phosphoproteine identifiziert werden. Der Nachweis kardialer Phosphoproteine sollte über eine LC-MS/MS-Analyse erfolgen, die eine MS-kompatible, im Hinblick auf die zu untersuchende Phosphorylierung geeignete Probenaufarbeitung erforderte. Basierend auf den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse sollte mit ausgewählten Phosphorylierungsstellen ein MRM-Scan zur relativen Quantifizierung der Phosphorylierung durchgeführt werden. Zwei im MRM-Scan analysierte Proteine mit stark erhöhter Phosphorylierung unter β -adrenerger Stimulation, Myozenin-2 (MYOZ2) und G protein signaling modulator 1 (GPSM1), sollten des Weiteren, besonders in Hinblick auf die neue β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstelle, funktionell charakterisiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Kits

Tabelle 2.1.1.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
(-)-Isoprenalin HCL	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
(±)-Propranolol HCL	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
[³² P] Phosphorsäure (10 mCi/ml)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig (Braunschweig, D)
[³⁵ S] L-Methionin (10 mCi/ml)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig (Braunschweig, D)
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
1 kb DNA-Leiter	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
2-Mercaptoethanol	AppliChem (Darmstadt, D) Roth (Karlsruhe, D)
4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Acetonitril Lichrosolv	Merck (Darmstadt, D)
Agar	AppliChem (Darmstadt, D)
Agarose	Peqlab (Erlangen, D)
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, D)
Ammoniumhydroxid	Merck (Darmstadt, D)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, D)
Angiotensin II	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Complete Mini, Proteinaseinhibitoren	Roche (Mannheim, D)
Dialysiertes FBS	GIBCO (Karlsruhe, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO (Karlsruhe, D)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem (Darmstadt, D)
FCS, dialysiert	GIBCO (Karlsruhe, D)
Fetales bovines Serum (FBS)	PAN (Aidenbach, D) GIBCO (Karlsruhe, D)
Forskolin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Glutamin	GIBCO (Karlsruhe, D)
Glycerol	Merck (Darmstadt, D)
Glycin	AppliChem (Darmstadt, D)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt, D)
HEPES	AppliChem (Darmstadt, D)
IAA	Merck (Darmstadt, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem (Darmstadt, D)
Kanamycin	Fluka (Seelze, D)

LDS 4x Probenpuffer	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Leptomycin B (LMB)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Magermilch	AppliChem (Darmstadt, D)
Marker 12 Molekulargewichtsmarker	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Methanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Minimum Essential Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
MOPS 10x Laufpuffer	Invitrogen (Karlsruhe, D)
NAMP100V Amplify	GE Healthcare (Freiburg, D)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Opti-MEM® I	GIBCO (Karlsruhe, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Penicillin/Streptomycin	GIBCO (Karlsruhe, D) PAN (Aidenbach, D)
Pepton	AppliChem (Darmstadt, D)
Phenylephrin (PE)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Phosphate buffered saline (PBS) (steril)	GIBCO (Karlsruhe, D)
Phosphatfreies Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO (Karlsruhe, D)
Phosstop	Roche (Mannheim, D)
Phthalsäure	Merck (Darmstadt, D)
Poly-D-Lysine	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare (Freiburg, D)
Protein Leiter	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Rotiporese Gel 30 (5:1 Acrylamid-Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure 37% (HCl)	Merck (Darmstadt, D)
Silbernitrat	Fluka (Steinheim, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
TiO ₂ Partikel	GL Science (Tokio, Japan)
Trifluoressigsäure	Merck (Darmstadt, D)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem (Darmstadt, D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Trypanblau	AppliChem (Darmstadt, D)
Tween® 20	AppliChem (Darmstadt, D)
Vectashield-Dapi	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Vitamin B12	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

Tabelle 2.1.1.2: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Gerichtet gegen	Hergestellt in	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa488-anti-Maus IgG	Maus	Ziege	1:200 (10 µg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Alexa594-anti Kaninchen IgG	Kaninchen	Ziege	1:200 (10 µg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Calcineurin (monoklonal, Klon 29)		Maus	1:1000	BD (Heidelberg, D)
Calsarcin-1 (monoklonal, Klon 41)		Maus	1:1000 250 µg/ml	BD (Heidelberg, D)
GFP		Kaninchen	1:1000 (2 mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Gβ (T-20)		Kaninchen	1:5000	Santa Cruz (Heidelberg, D)
HA.11-Antikörper		Maus	1:1000 (1 mg/ml)	HISS Diagnostics GmbH (Freiburg, D)
HRP-anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	1:10.000 (0,8 µg/ml)	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, GB)
HRP-anti-Maus	Maus	Ziege	1:10.000 (0,8 µg/ml)	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, GB)
Myozenin-2 (N-12)		Ziege	1:50	Santa Cruz (Heidelberg, D)
p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)		Kaninchen	1:1000	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)		Kaninchen	1:1000	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
pS37-MYOZ2		Kaninchen	3 µg/20 ml	Gramsch Laboratories (Schwabhausen, D)
Telethonin (monoklonal, Klon 53)		Maus	1:1000	BD (Heidelberg, D)
V5 (monoklonal)		Maus	1:5000 (2 mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
α-Actinin (monoklonal, Klon EA-53)		Maus	1:1000	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

Tabelle 2.1.1.3: Übersicht über die verwendeten Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
Benzonase	Merck (Darmstadt, D)
BP Clonase II	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Difco Trypsin 250	BD (Heidelberg, D)
LR Clonase II	Invitrogen (Karlsruhe, D)
LR Clonase II Plus	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Proteinase K	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
Trypsin	GIBCO (Karlsruhe, D) Fluka (Steinheim, D)
Trypsin EDTA	GIBCO (Karlsruhe, D)

Tabelle 2.1.1.4: Übersicht über die verwendeten Kits

Kit	Bezugsquelle
Adeno-X Rapid Titer Kit	Clontech (Heidelberg, D)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Bonn, D)
ECL Plus	GE Healthcare (Freiburg, D)
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen (Hilden, D)
Luciferase Assay System	Promega (Mannheim, D)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, D)
ProteoExtract® Subzellulär Proteome Extraction Kit	Merck (Darmstadt, D)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, NL)
TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega (Mannheim, D)

2.1.2 Plasmide, Oligodesoxyribonukleotide

Zur Klonierung der murinen Proteine Myozenin-2 (MYOZ2), Filamin C (FLNC) und LIM domain binding 3 (LDB3) wurden folgende Klone der Firma ImaGenes (Berlin, D) verwendet: IRAPv968G0974D (MYOZ2), IRCKp5014D1817Q (FLNC) und IRCKp5014K1113Q (LDB3). Alle kodierenden Sequenzen wurden in den Vektor pT-Rex-DEST30 inseriert. G α i-YFP (GNAI1, YFP-Insertion zwischen Aminosäure 91 und 92, Ratte), G α i (GNAI1, nachträglich mit N-terminalem V5-tag versehen, Ratte) und der α_2 A-adrenerge Rezeptor (ADRA2A, Maus) wurden von der Arbeitsgruppe Bünemann (Institut für Pharmakologie und klinische Pharmazie, Marburg, D) erhalten, inseriert in pcDNA3.1(+). Das humane Calcineurin (PPP3CB) stammte von der Arbeitsgruppe Ritter (Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, D), wobei die kodierende Sequenz in den pT-Rex-DEST30 inseriert wurde. Das Luciferase Reporter-

Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe Molkentin (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Ohio, USA) erhalten. Die restlichen Konstrukte wurden aus Maus-cDNA kloniert und über homologe Rekombination in den Vektor pT-Rex-DEST30 inseriert. Alle Konstrukte zur Expression im zellfreien System befanden sich in dem Vektor pcDNA3.1(+). Als viraler Expressionsvektor wurde der Vektor pAd/CMV/V5-DEST verwendet.

Tabelle 2.1.2.1: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Name	Bezugsquelle
pAd/CMV/V5-DEST	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pcDNA3.1(+)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pDONR221	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pDONR221P1-P4	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pDONR221P3-P2	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pDONR221P4r-P3r	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pENTR1A	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pT-Rex-DEST30	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten synthetisierten die Firmen MWG Biotech (Martinsried, D) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D). Die lyophilisierten Primer wurden mit ddH₂O auf Stockverdünnungen von 1 nmol/μl eingestellt, welche als Grundlage für die Primer-Arbeitsverdünnungen von 20 pmol/μl (Stockverdünnung 1/50 mit ddH₂O) dienten. Primer zur gerichteten Mutagenese wurden direkt auf 125 ng/μl mit ddH₂O verdünnt. Die Lagerung der Primerverdünnungen erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2.1.2.2: Übersicht über die verwendeten PCR-Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Bezugsquelle
MYOZ2 MM cds fw	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcgctatcacatagcgccatg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM cds rw	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcacaggtcatctgattccgg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM B4r fw	ggggacaactttctatacaaagttgtcaccatgctatcacatagcgccatg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM B3r rw	ggggacaactttattatacaaagttgttcagggtcatctgattccggtac	MWG Biotech (Martinsried, D)
EcoRI HA fw	aaagaattcatgtaccatcacgatgttcagattacgct	MWG Biotech (Martinsried, D)
NotI MYOZ2 rw	aaagcggccgctcacaggtcatctgattccggtacag	MWG Biotech (Martinsried, D)
HA MYOZ2 fw	gttcagattacgctatgctatcacatagcgccatggtg	MWG Biotech (Martinsried, D)
TCAP MM fw	atggccacttcagagctgagctgccaagtgtctg	MWG Biotech (Martinsried, D)
TCAP MM rw	tcagcctctctgagcttcctgagacatggatcg	MWG Biotech (Martinsried, D)
TCAP MM att fw	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcagggcacttcagagctgag	MWG Biotech (Martinsried, D)

TCAP MM att rw	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcagcctctct-gagcttctg	MWG Biotech (Martinsried, D)
FLNC MM V5 fw1	cctctctcgggtctcgattctacgggacgcatgaaggaaag-catc	MWG Biotech (Martinsried, D)
FLNC MM att rw	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgggcacatt-gaccttgaagggg	MWG Biotech (Martinsried, D)
LDB3 MM V5 fw	cctctctcgggtctcgattctacgatgtcttacagtgtgac	MWG Biotech (Martinsried, D)
LDB3 MM att rw	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctacacggt-gatggcatgtgcg	MWG Biotech (Martinsried, D)
att V5 fw	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcatggg-taagcctatccctaaccctctcctcg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
att V5 fw	gctttcatgggtaagcctatccctcttctcgggtctcgattctacg	MWG Biotech (Martinsried, D)
att V5 fw2	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcatggg-taagcctatc	MWG Biotech (Martinsried, D)
GPSM1 MM rw	ttagctggcaccgggtggacactga	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM HA fw	atgtaccatagcgtgtccagattacgctatggatgac-cagcgctgtcc	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
att HA fw	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcatgtaccat-tacgatgttcc	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM rw att	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcTtagctgg-cacccgggtggac	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM fw B4r	ggggacaacttttctatacaaagttgtcaccatggatgac-cagcgctgtccctgg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM rw B3r-stop	ggggacaactttattatacaaagttgtgctggcaccgggtgga-cactgctgc	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 gl2 MM fw	atgacagaggagttctttgacctc	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 gl2 MM rw	ttagaggggtgatgcgtagcccagg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 gl2 MM rw-stop B3r	ggggacaactttattatacaaagttgtgaggggtgatgcg-tagcccagg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 gl2 MM fw B4r	ggggacaacttttctatacaaagttgtcaccatgacagag-gagttctttgac	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 gl2 MM S567A rw	ttagaggggtgatgcgtagcccaggcaggctgcctacgg-cagccctctgg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 gl2 MM S567D rw	ttagaggggtgatgcgtagcccaggcaggctgcctacgt-cagccctctgg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
G α i RN V5 fw	cctaaccctctcctcgggtctcgattctacgatgggctgca-cactgagcgc	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
G α i RN rw	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcttagaagagac-cacagtcttttagg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

Tabelle 2.1.2.3: Übersicht über die verwendeten Mutagenese-Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Bezugsquelle
MYOZ2 MM S37A fw	cctgggcaaaaaagttgccatccccagagacatcatg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM S37A rw	catgatgtctctggggatggcaactttttgcccagg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM S37D fw	cctgggcaaaaaagttgacatccccagagacatcagatag	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM S37D rw	ctatcatgatgtctctggggatgtcaactttttgcccagg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM S116A fw	cgccccgatccacgagcccccccaatccagag	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM S116A rw	ctctggatttgggggggctcgtggatcgggggcg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM S37 fw	cctgggcaaaaaagttagcatccccagagacatcatg	MWG Biotech (Martinsried, D)
MYOZ2 MM S37 rw	catgatgtctctggggatgctaactttttgcccagg	MWG Biotech (Martinsried, D)
GPSM1 MM S567A fw	ctggacgaccagagggtgccgtagcagcctgcctgg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM S567A rw	ccaggcaggctgcctacggcagccctctggtcgtccag	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM S567D fw	ctggacgaccagagggtgaggtagcagcctgcctgg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM S567D rw	ccaggcaggctgcctacctcagccctctggtcgtccag	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM S567E fw	ctggacgaccagagggtgaggtagcagcctgcctgg	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
GPSM1 MM S567E rw	ccaggcaggctgcctacctcagccctctggtcgtccag	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

2.1.3 Puffer, Lösungen und Nährmedien

2.1.3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Milch Blockpuffer

Tris (1 M; pH 7,5)	3 ml
NaCl	1,75 g
Tween® 20	0,3 ml
ddH ₂ O	ad 300 ml
Magermilchpulver	5%

BSA Blockpuffer

Tris (1 M; pH 7,5)	50 ml
NaCl	8,7 g
BSA	20 g
NP-40	2 ml
NaN ₃	300 mg
ddH ₂ O	ad 1 l

BSA Waschpuffer

Tris (1 M; pH 7,5)	50 ml
NaCl	8,7 g
BSA	5 g
NP-40	2 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Ladepuffer

- für Agarosegele

Bromphenolblau	0,025 g
EDTA (0,5 M)	1,4 ml
Glycerol	3,6 ml
ddH ₂ O	ad 12 ml

- für Polyacrylamidgele

2x Ladepuffer

Tris (pH 6,8)	125 mM
SDS	140 mM
Glycerol	20% (v/v)
Bromphenolblau	10 µg/ml
ddH ₂ O	ad 40 ml
β-MeSH (frisch zugegeben)	5%

6x Ladepuffer

Tris (pH 6,8)	375 mM
SDS	12%
Glycerol	60% (v/v)
DTT	0,6 M
Bromphenolblau	10 µg/ml
ddH ₂ O	ad 40 ml

Laufpuffer (10x)

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	15 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Paraformaldehyd (4%)

PFA	20 g
PBS (1x)	480 ml
Lösung auf 60°C erhitzen	
NaOH (1M) bis pH 7,2	
PBS (1x)	ad 500 ml
Lagerung bei -20°C	

PBS (10x)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
ddH ₂ O	ad 1 l

PBST

PBS (10x)	100 ml
Tween® 20	1 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

0,05% PBST

PBS (10x)	100 ml
Tween® 20	0,5 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Puffer für Sammelgele (4x)

Tris	61 g
SDS (10%)	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
HCl (37%) bis pH 6,7	

Puffer für Trenngele (4x)

Tris	182 g
SDS (10%)	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
HCl (37%) bis pH 8,8	

Tris-Acetat-EDTA (TAE) - Puffer (50x)

Tris	0,2 M
Essigsäure	5,7%
EDTA (0,5 M)	10%
ddH ₂ O	ad 1 l

Transferpuffer

Tris (1M, pH 8,3)	25 ml
Glycin	11,26 g
Methanol	100 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

2% SDS-Lysepuffer

Tris (pH 6,7)	50 mM
SDS	2%
Na ₃ VO ₄	1 mM
ddH ₂ O	ad 10 ml
Complete Mini, Proteaseinhibitoren	1 Tablette/10 ml
Phosstop, Phosphataseinhibitoren	1 Tablette/10 ml

CoIP-Lysepuffer

Hepes	50 mM
NaCl	250 mM
EDTA	5 mM
NP-40	0,1%
ddH ₂ O	ad 500 ml
pH 7,4	
Complete Mini, Proteaseinhibitoren	1 Tablette/10 ml
Phosstop, Phosphataseinhibitoren	1 Tablette/10 ml

IP-Lysepuffer

Hepes	50 mM
NaCl	250 mM
EDTA	5 mM
NP-40	0,5%
ddH ₂ O	ad 500 ml
pH 7,4	
Complete Mini, Proteaseinhibitoren	1 Tablette/10 ml
Phosstop, Phosphataseinhibitoren	1 Tablette/10 ml

Membran Stripping Puffer

Glycin	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 2,2	

CIP-Puffer

Tris (1 M, pH 8,0)	250 µl
NaCl (1,5 M)	333 µl
MgCl ₂	50 µl
DTT (1 M)	5 µl

TNT-CoIP-Puffer

Tris (1 M)	25 ml
NaCl (1,5 M)	50 ml
NP40	0,01%
BSA	1 µg/ml
ddH ₂ O	ad 500 ml
pH 7,5	

0,5 M IAA Lösung

Jodacetamid	9,25 mg
ddH ₂ O	100 µl
bei 4°C im Ultraschallbad lösen	

50 mM NH₄HCO₃

NH ₄ HCO ₃	3,953 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Fixierlösung für Silberfärbung

EtOH	40 ml
Essigsäure	10 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

0,02% Natriumthiosulfatlösung

Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0,03138 g
ddH ₂ O	ad 100 ml
- frisch zubereitet	

0,1% Silbernitratlösung

AgNO ₃	0,1 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

Entwicklerlösung für Silberfärbung

Na ₂ CO ₃	3 g
Formaldehyd (frisch zugeben)	0,05 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

0,05 M EDTA

EDTA	0,05 M
ddH ₂ O	ad 100 ml

IMAC-Ladepuffer

Essigsäure	
MeCN	3 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml
pH 2,7	

TiO₂-Ladepuffer

TFA	0,25 ml
MeCN	8 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml
Phthalsäure bis zur Sättigung zugeben	

Elutionspuffer E1

NH ₄ OH	280,5 µl
MeCN	3 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml

Elutionspuffer E2

NH ₄ OH	420,7 µl
MeCN	3 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml

Elutionspuffer E3

NH ₄ OH	561,0 µl
MeCN	3 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml

P1 Minipräparationspuffer

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 8,0	
Zugabe von 100 mg RNase/l nach Autoklavierung	

P2 Minipräparationspuffer

NaOH	200 mM
SDS	10 g
ddH ₂ O	ad 1 l

P3 Minipräparationspuffer

Natriumacetat	246,09 g
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 5,5	

3 M NaAcetat

Natriumacetat	246,09 g
ddH ₂ O	ad 1 l

FRET-Puffer

NaCl	137 mM
KCl	5,4 mM
Hepes	10 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM
pH 7,3	

2.1.3.2 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Alle in der Zellkultur verwendeten Puffer und Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

BrdU

BrdU	230 mg
ddH ₂ O	74,8 ml
Lagerung bei -20°C	

Calcium- and bicarbonate free Hanks with Hepes (CBFHH)

NaCl (3 M)	40 ml
KCl (0,5 M)	10 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,08 M)	10 ml
KH ₂ PO ₄ (0,05 M)	10 ml
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (0,03 M)	10 ml
HEPES	4,76 g
Glucose	1 g
ddH ₂ O	ad 1 l
NaOH bis pH 7,3	
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Lagerung bei 4°C	

DNase

DNase	100 mg
NaCl (0,9%)	50 ml
Lagerung bei -20°C	

Trypsinlösung

Difco Trypsin 250	300 mg
CBFHH	200 ml
DNase	2 ml

Vitamin B12

Vitamin B12	100 mg
ddH ₂ O	50 ml
Lagerung bei -20°C	

10 mM Tris

Tris	1,2114 g
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 8,0	

2.1.3.3 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien wurden steril hergestellt und bei 4°C gelagert.

LB-Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH (1 N)	1 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

LB-Agar

Agarose	15 g
LB-Medium	ad 1 l

NRCM-Basismedium

MEM	10,8 g
Vitamin B12	1 ml
NaHCO ₃	350 mg
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 7,3	

NRCM-Kulturmedium

FBS – 0,1%, 1% oder 5% (PAN)	0,5 ml, 5 ml oder 25 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
BrdU	5 ml
NRCM Basismedium	ad 500 ml

Preplating-Medium

FBS (PAN)	25 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
NRCM Basismedium	ad 500 ml

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und Aufarbeitung zur massenspektrometrischen Analyse

2.2.1.1 *Injektion und Proteinpräparation aus Mausherzen*

Männliche FVB-Mäuse im Alter von ~5 Wochen wurden intraperitoneal mit 500 µl einer (-)-Isoprenalin HCL-Lösung (2 mg/ml, in sterilem Wasser gelöst) oder mit 100 µl einer (±)-Propranolol HCL-Lösung (1 mg/ml, in sterilem Wasser gelöst) injiziert. Die Entnahme der Mausherzen fand bei den mit (-)-Isoprenalin HCL injizierten Mäusen nach 2 min, im Fall der mit (±)-Propranolol injizierten Mäuse nach 5 h statt. Die Herzen wurden nach Abtrennung des rechten Ventrikels in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Für die Präparation von Proteinen aus Mausherzen wurde der 2% SDS-Lysepuffer verwendet. Ein Herz wurde in gefrorenem Zustand in 900 µl gekühltem Lysepuffer aufgenommen und auf Eis homogenisiert (T10 basic ULTRA-TURRAX, Ika, Staufen). Im Anschluss wurden die Herzlysate mit 5% Benzonase (1/10) 10 min bei RT zur DNA-Degradation behandelt. Die Inaktivierung der Benzonase fand im Ultraschallbad (5 min, 4°C) statt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm für 10 min wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Bonn, D) (2.2.4.2) bestimmt. Von jeder Probe wurden 10 mg Protein für die weitere Probenaufbereitung eingesetzt. Der nachfolgende Prozess der Probenaufarbeitung erfolgte mit Unterstützung der Arbeitsgruppe Sickmann (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften-ISAS, Dortmund, D).

2.2.1.2 Reduktion und Carbamidomethylierung

Vor tryptischem Verdau wurde jede Probe mit 10 mM DTT für 30 min bei 56°C und 350 rpm zur reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken behandelt. Nach Abkühlung auf RT wurden die Proben mit 0,5 M IAA-Lösung auf eine Konzentration von 20 mM eingestellt. Während einer dreißigminütigen Inkubationszeit im Dunkeln bei RT fand die Alkylierung der Sulfhydrylgruppen der Proteine statt. Überschüssiges IAA wurde mit 5 mM DTT inaktiviert.

2.2.1.3 Proteinverdau und Verdaukontrolle

Da die hohe SDS-Konzentration des Lysepuffers mit dem anschließenden Trypsinverdau nicht kompatibel war, wurden die Proben mit 50 mM NH_4HCO_3 20/1 verdünnt. Die verbleibenden 0,1% SDS interferierten nicht mit dem Probenverdau. Vor Enzymzugabe wurden 20 μl unverdaute Probe für die Verdaukontrolle entnommen und bei -20°C gelagert. Jede Probe wurde mit 600 μl Trypsinlösung (1 mg Trypsin in 1,2 ml 1 mM HCl, frisch hergestellt) versetzt und bei 37°C und 400 rpm über Nacht (ü. N.) verdaut. Anschließend wurden weitere 20 μl zur Verdaukontrolle entnommen. 5 μl der jeweiligen Aliquots wurden mit 10 μl ddH₂O und 5 μl 4x LDS Ladepuffer versetzt und bei 85°C für 7 min erhitzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.2.6.3.1) erfolgte eine Visualisierung der Proteine mittels Silberfärbung (2.2.6.5).

2.2.1.4 Entsalzung

Der Phosphopeptidanreicherung vorangehend, wurde eine C18-Festphasenextraktion über eine Bond Elut C18-Säule (30mg Sorbent Masse, 3 ml Volumen, Partikeldurchmesser 40 μm , Varian, Darmstadt, D) durchgeführt. Durch hydrophobe Wechselwirkung wurden die Peptide an eine lipophile Silika-Matrix (Abb. 13) gebunden, hydrophile nicht-bindende Verunreinigungen konnten ausgewaschen werden, während stark bindende Lipide an die Säulenmatrix gebunden blieben.

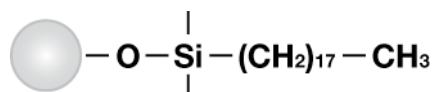


Abbildung 13: Struktur des verwendeten C18-Sorbent.

Vor Auftragen der Peptidlösung auf die Säule wurde der pH-Wert der Proben mit TFA (Tri-fluoressigsäure) auf pH 3,0 eingestellt.

Purifikationsschema:

Schritt		Reagenz
Equilibrierung		3 ml MeOH 6 ml 0,1% TFA
Probenaufgabe		
Waschen		6 ml 0,1% TFA
Fraktionierte Elution	1. Fraktion	3 ml 20% MeCN in 0,1% TFA
	2. Fraktion	3 ml 40% MeCN in 0,1% TFA
	3. Fraktion	3 ml 60% MeCN in 0,1% TFA

Die Eluate der einzelnen Fraktionen wurden vereinigt und auf ~100 µl unter Vakuum eingengt. Im Anschluss wurde die Probe auf zwei 2 ml-Reaktionsgefäße gleichmässig aufgeteilt (5 mg Peptid/Reaktionsgefäß) und das restliche Acetonitril (MeCN) durch erneutes Eindampfen entfernt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 Anreicherung und Aufreinigung phosphorylierter Peptide

IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)

Für 5 mg verdautes Protein wurden 300 µl (entspricht 150 µl Reinmaterial) PHOS-Select Iron Affinity Gel Slurry (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D) eingesetzt. Das Gel wurde 2x für jeweils 5 min in 750 µl IMAC-Ladepuffer (250 mM Essigsäure, 30% MeCN, pH 2,7) equilibriert und anschließend zu den Proben gegeben. In 2 ml IMAC-Ladepufferendvolumen wurde das Gel-Peptidgemisch unter leichtem Schütteln für 2 h inkubiert. Nach Zentrifugation (3 min, 8200 g) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Gel in 600 µl IMAC-Ladepuffer aufgenommen und langsam auf eine SigmaPrep *Spin-Column* (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D) transferiert. Nach einminütiger Inkubation unter leichtem Schütteln wurde der Überstand über die Säule abzentrifugiert (1 min, 8200 g). Das Gel wurde in weiteren 600 µl IMAC Ladepuffer aufgenommen und der Waschvorgang wiederholt. Als letzter Waschschrift folgte eine einminütige Inkubation in 600 µl ddH₂O. Die anschließende Elution wurde in drei Schritten mit ansteigendem Ammoniumhydroxidgehalt des Elutionspuffers durchgeführt. Steigende Volumina 10% TFA wurden zur Neutralisation der stark alkalischen Elutionspuffer in das Auffanggefäß vorgelegt. Nach der Elution wurde ein pH<3 des Eluates sichergestellt. Das Acetonitril des Eluates wurde durch Einengen der Probe unter Vakuum entfernt.

Schritt		Reagenz	Dauer
Equilibrierung des Gels		2x 750 µl IMAC Ladepuffer	5 min, leichtes Schütteln
Probenaufgabe			
Inkubation		2 ml IMAC Ladepuffer Endvolumen	2 h, leichtes Schütteln
Waschen		2x 600 µl IMAC Ladepuffer 1x 600 µl ddH ₂ O	3x 1 min, leichtes Schütteln
Elution	E1 200 mM NH ₄ OH	300 µl Elutionspuffer E1 Vorlage von 30 µl 10% TFA im Auffanggefäß	3x 5 min, leichtes Schütteln
	E2 300 mM NH ₄ OH	300 µl Elutionspuffer E2 Vorlage von 60 µl 10% TFA im Auffanggefäß	
	E3 400 mM NH ₄ OH	300 µl Elutionspuffer E3 Vorlage von 90 µl 10% TFA im Auffanggefäß	

Nach der Elution wurden die Proben mit 0,1% TFA ad 1 ml aufgefüllt und erneut über eine Bond Elut C18-Säule (30 mg Sorbent, Varian, Darmstadt, D) entsalzt.

Schritt		Reagenz
Equilibrierung		3 ml MeOH 3 ml 0,1% TFA
Probenaufgabe		
Waschen		3 ml 0,1% TFA
Fraktionierte Elution	1. Fraktion	200 µl 15% MeCN in 0,1% TFA
	Waschen	80 µl 0,1% TFA
	2. Fraktion	200 µl 35% MeCN in 0,1% TFA
	Waschen	80 µl 0,1% TFA
	3. Fraktion	200 µl 55% MeCN in 0,1% TFA

Die Fraktionen eins bis drei wurden durch Einengen im Vakuum auf ca. 30 µl reduziert.

TiO₂

Für 5 mg verdautes Proteine wurden 20 mg TiO₂ verwendet. Die Peptide wurden in 1 ml TiO₂-Ladepuffer aufgenommen und mit TiO₂ 30 min unter starkem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min, 16100 g) wurde der Überstand abgenommen und die Proben 2x für 1 min unter Schütteln mit 600 µl Ladepuffer gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschritten in 80% MeCN, 0,1% TFA (jeweils 1 min, unter Schütteln) folgten zwei Waschschrritte in 0,1% TFA. Die Elution wurde analog zur IMAC-Anreicherung durchgeführt. Der pH-Wert der eluierten Proben wurde ebenfalls auf < 3 eingestellt und das MeCN abgedampft.

Schritt		Reagenz	Dauer
Probenaufgabe			
Inkubation		1 ml TiO ₂ Ladepuffer	30 min, starkes Schütteln
Waschen		2x 600 µl TiO ₂ Ladepuffer 2x 60 µl 80% MeCN, 0,1% TFA 2x 600 µl 0,1% TFA	Jeweils 2x 1 min, starkes Schütteln
Elution	E1 200 mM NH ₄ OH	300 µl Elutionspuffer E1 Vorlage von 30 µl 10% TFA im Auffanggefäß	3x 5 min, starkes Schütteln
	E2 300 mM NH ₄ OH	300 µl Elutionspuffer E2 Vorlage von 60 µl 10% TFA im Auffanggefäß	
	E3 400 mM NH ₄ OH	300 µl Elutionspuffer E3 Vorlage von 90 µl 10% TFA im Auffanggefäß	

Die anschließende Entsalzung der Proben erfolgte analog zu 2.2.1.4. Die eluierten Fraktionen eins bis drei wurden ebenfalls durch Einengen auf 30 µl Endvolumen reduziert.

2.2.1.6 Probenaufarbeitung zur relativen Quantifizierung mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Die Aufarbeitung der Proben für den MRM-Scan wurde analog zu 2.2.1.1-2.2.1.5 durchgeführt, allerdings wurde für die Anreicherung der Phosphopeptide ausschließlich das TiO₂-Verfahren angewandt. Auf die anschließende Entsalzung und fraktionierte Elution nach Phosphorpeptidanreicherung wurde verzichtet. Für jedes der gemessenen Phosphopeptide wurden vier Übergänge definiert, die aus dem jeweiligen Fragmentationenspektrum des MS/MS-Screens entnommen wurden. Um mögliche Verluste während der Aufarbeitung zu überprüfen, wurden folgende synthetische Phosphopeptidstandards den jeweiligen Lysaten zugesetzt: Standard 1 (SVENLPEAGIpTHEQR), 24 pmol/Probe, Standard 2 (PQEFSpSVERGR), 80 pmol/Probe, Standard 3 (LIEDNEpYTAR), 24 pmol/Probe. Standard 1 und 2 wurden in der 1. MRM Messung verwendet und nach dem Trypsin-Verdau zugegeben. Standard 1 und 3, welche beide keine Trypsin-Schnittstelle enthielten, wurden in Messung 2 und 3 vor Trypsin-Verdau zugegeben.

2.2.2 Massenspektrometrische Analyse der angereicherten Phosphopeptide

Die massenspektrometrische Messung der angereicherten Phosphopeptide wurde von Dr. René Zahedi (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften, ISAS, Dortmund, D) übernommen. Die nano-LC-MS/MS-Analyse von jeweils zwei mit Isoprenalin bzw. Propranolol behandelten Mausherzen (aufgeteilt in drei getrennt analysierte Elutionsfraktionen/Herz) er-

folgte auf einem Qstar Elite Massenanalysator (Applied Biosystems, Darmstadt, D), die drei MRM-Scans wurden auf einem Qtrap 4000 Massenanalysator (Applied Biosystems, Darmstadt, D) durchgeführt.

2.2.3 Datenbanksuche und Spektreninterpretation

Für die Datenbanksuche der nano-LC-MS/MS-generierten Daten wurde der Mascot Suchalgorithmus (Matrix Science, London, GB) genutzt. Gesucht wurde gegen die Swiss-Prot Datenbank 56.1 mit der Taxonomie *Mus Musculus*. Trypsin wurde als Protease gewählt, wobei maximal zwei überlesene Schnittstellen toleriert wurden. Als Suchparameter wurde als fixe Modifikation die Carbamidomethylierung von Cystein gewählt, als variable Modifikation die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin. Alle Spektren wurden zusätzlich manuell validiert, generell wurden nur Spektren \geq des Mascot Schwellenwertes ($P < 0,05$) in die Auswertung einbezogen. Bei Spektren, deren Score gleich des Mascot-Schellenwertes war, handelte es sich um bereits in der Swiss-Prot Datenbank annotierte Phosphorylierungsstellen.

2.2.4 Echokardiographie

Die echokardiographische Analyse (Vevo 770, VISUALSONICS, Toronto, Kanada; RMV 707B Schallkopf) der linksventrikulären Funktion von Mäusen wurde von einer routinierten, ausgebildeten Fachkraft übernommen. Die Mäuse wurden während der Messung mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran unter leichter Narkose gehalten.

2.2.5 DNA-Analytik

2.2.5.1 Transformation von kompetenten Zellen

Die Transformation von kompetenten Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Bei dem verwendeten Bakterienstamm handelte es sich um elektrokompetente DH10b-Zellen, die bei -80°C gelagert wurden. 50 μl Bakteriensuspension wurden auf Eis aufgetaut und mit max. 2 μl DNA Lösung (max. 100 ng DNA) versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Plasmid-Bakterien-Suspension in eine gekühlte Küvette (Gene Pulser^R 0,1 cm Küvette; BIO-RAD, München, D) überführt und mit Hilfe eines elektromagnetischen Pulses (1,8 kV) elektroporiert (MicroPulserTM, BIO-RAD, München, D). Unmittelbar nach der Elektroporation wurde der Zellsuspension 450 μl antibiotikafreies LB-Medium (RT) zugesetzt und 1 h bei 37°C und 350 rpm im Thermomixer geschüttelt. Maximal 200 μl der Bakteriensuspension wurde auf einer LB-Platte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und ü. N. bei 37°C kultiviert.

2.2.5.2 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium für eine Mini-Präparation und 100 ml antibiotikahaltiges LB-Medium für eine Maxi-Präparation angeimpft und über Nacht bei 37°C und 170 rpm im Bakterieneschüttler (Kühner, Birsfelden, CH) kultiviert. Die Plasmid-Präparation erfolgte durch alkalische Lyse. Für eine Maxipräparation wurde der „Plasmid Maxi Quiagen Kit“ gemäß den Herstellerangaben genutzt. Für eine Minipräparation wurden in Anlehnung an das Quiagen Kit selbst hergestellte Minipräparationspuffer P1, P2 und P3 verwendet. 2 ml der Minipräparations-Kultur wurden bei 8000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. 250 µl Puffer P2 wurden der Suspension zugesetzt und 5 min bei RT lysiert. Unter kräftigem Mischen wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit 800 µl 100% EtOH gefällt und durch Zentrifugation (14000 g, 10 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 700 µl 70% EtOH gewaschen, kurz getrocknet und in 20 µl ddH₂O gelöst.

2.2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden unter Verwendung der AccuPrime *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, D) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte in einem Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, D).

Folgender allgemeiner Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen wurden verwendet:

Reaktionsansatz:

10x AccuPrime <i>Pfx</i> Reaction Mix	5,0 µl
xµl DNA-Template (~100 ng)	≥ 1,0 µl
<i>forward</i> Primer [20 µM]	1,0 µl
<i>reverse</i> Primer [20 µM]	1,0 µl
AccuPrime <i>Pfx</i> DNA Polymerase 2.5 U/µl	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 50,0 µl

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	2 min	95°C	
Denaturierung	15 sek	95°C	
35 Zyklen	Hybridisierung	30 sek	55-78°C
	Elongation	1 min/1 kb	68°C
Finale Elongation	5 min	68°C	

2.2.5.4 Nukleinsäureverdau mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von PCR-Fragmenten, Maxi- oder Minipräparationen geschah mittels Enzymen und zugehörigen Puffern (NEBuffer 1-4) der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D). Geeignete Enzyme, passende Puffer und die entsprechenden Reaktionsbedingungen wurden über die NEB-Internetseite (<http://www.neb.com/nebecomm/default.asp>) unter der Rubrik „NEB Tools“ ausgewählt. Die vom Hersteller gelieferte BSA-Verdünnung [10 mg/ml] wurde mit ddH₂O auf eine 10x-Lösung der Konzentration [1000 µg/ml] eingestellt und nach Bedarf dem Reaktionsansatz zugesetzt.

Folgender allgemeiner Reaktionsansatz wurde verwendet:

Reaktionsansatz:

DNA	5,0 µl Minipräparation
	1,0 µl Maxipräparation
10x NEBuffer	2,0 µl
10x BSA	2,0 µl
Enzym [20 U/µl]	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 20,0 µl

Der Reaktionsansatz verdaute für mindestens 1 h bei 37°C im Thermomixer. Der Verdau wurde im Anschluss mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (2.2.5.5).

2.2.5.5 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Amplifizierte DNA-Fragmenten oder verdaute DNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung (120 Volt, 400 mAmp) im Agarosegel (0,8-1% Agarose; 1 mg/l Ethidiumbromid in 1x TAE Puffer) analysiert. Je nach Größe des zu untersuchenden DNA-Fragmentes wurde der 1 kb-Marker oder der 100 bp-Marker der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D) als DNA-Leiter verwendet. Zur Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) wurde eine DeVision DBox (Decon Science Tec, Hohengandern, D) benutzt.

2.2.5.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung neu generierter DNA-Konstrukte übernahm der Sequenzierungsservice „Value Read Tubes“ der Firma MWG Biotech (Martinsried, D). Hierfür wurde eine DNA-Verdünnung von 2 µg DNA in 20 µl ddH₂O hergestellt. Als Sequenzierungsprimer wurden in der Regel die Standardprimer der Firma MWG Biotech genutzt. Falls kein geeigneter Standardprimer zu Verfügung stand, erfolgte das Design geeigneter Sequenzierungsprimer mit Hilfe des „Design a Primer-Tool“ der Firma MWG (<http://www.eurofinsdna.com>). Die Synthese dieser spezifischen Sequenzierungsprimer wurde ebenfalls von der Firma MWG übernommen.

2.2.5.7 Ligation von Nukleinsäuren

DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-Ligase und des T4-Ligase-Reaktionspuffers der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D) ligiert. Das zur Ligation eingesetzte Verhältnis von verdautem Vektor und Insert wurde nach dieser Formel berechnet:

$$\text{Masse Insert [ng]} * \text{Vektor [bp]} = 3 * \text{Masse Vektor [ng]} * \text{Insert [bp]}$$

Folgender allgemeine Reaktionsansatz wurde verwendet:

Reaktionsansatz:

10x T4-Ligase Reaktionspuffer	2,0 µl
verdauter Vektor	x µl
Insert	x µl
T4-Ligase [1 U/µl]	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 20,0 µl

Die Ligation wurde für 2 h bei 25°C oder 16 h bei 16°C durchgeführt. Als Kontrolle diente der Reaktionsansatz ohne Insert.

2.2.5.8 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragment aus einer Agarosegelmatrix wurde die DNA bei niedriger UV-Lichtintensität mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der DNA von der Silica-Membran-Säule erfolgte mit 20 µl ddH₂O.

2.2.5.9 EtOH-Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von Nukleinsäuren wurde 0,1x Volumen 3 M NaAcetat zu der jeweiligen DNA-Verdünnung gegeben und anschließend mit 3x Volumen 100% EtOH versetzt. Gut gemischt wurde die Lösung 10 min bei -20°C gekühlt. Nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das DNA-Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Die DNA wurde in 20 µl ddH₂O gelöst.

2.2.5.10 Gerichtete Mutation von Nukleotiden

Zur gerichteten Mutation von Nukleotiden zum Austausch einzelner Aminosäuren wurde der QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, NL) genutzt. Die Mutagenese-PCR-Primer wurden gemäß dem Herstellerprotokoll designed, wobei sich die Basenmisspaarung in der Mitte des Primers befand, flankiert von 10-15 sich paarenden Nukleotiden. Die Schmelztemperatur der Primer betrug in der Regel $\geq 78^{\circ}\text{C}$.

Reaktionsansatz der Mutations-PCR:

10x AccuPrime Pfx Reaction Mix	5,0 µl
xµl DNA-Template (~50 ng)	$\geq 1,0 \mu\text{l}$
Primer 1 [125 ng]	1,0 µl
Primer 2 [125 ng]	1,0 µl
dNTP Mix	1,0 µl
PfuUltra HF DNA Polymerase (2.5 U/µl)	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 50,0 µl

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	30 sek	95°C
Denaturierung	30 sek	95°C
16 Zyklen	Hybridisierung	1 min 55°C
	Elongation	1 min/1 kb 68°C
Finale Elongation	5 min	68°C

Zum Verdau des methylierten Template-Plasmids wurde der abgekühlte Reaktionsansatz mit 1 µl Restriktionsenzym DpnI (10 U/µl) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Transformation des Restriktionsverdaus erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll durch Elektroporation (2.2.5.1). Die erfolgreiche Mutation der Plasmid-DNA wurde stets durch Sequenzierung überprüft.

2.2.5.11 Gateway-Klonierung

Zur Klonierung der verwendeten Konstrukte wurde vorwiegend die GATEWAY-Technologie (Invitrogen, Karlsruhe, D) benutzt. Diese Technologie beinhaltet die Konstruktion eines Entry-Vektors (BP-Reaktion), der durch homologe Rekombination in einen Expressionsvektor überführt wird (LR-Reaktion). Neben der Standard 1-Fragmentklonierung wurde die Konstruktion von Fluorophor-fusionierten Proteine mittels der 3-Fragmentklonierung durchgeführt.

Folgende, für die BP-Reaktion notwendigen *Attachment-Sites* (att-Sites), wurden in die PCR-Primer integriert:

1-Fragmentklonierung:

attB1 (fw): 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

attB2 (rw): 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

3-Fragmentklonierung:

attBr4 (fw): 5'-GGGGACAACCTTTTCTATACAAAGTTGTCACC-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

attBr3 (rw): 5'-GGGGACAACCTTTATTATACAAAGTTGT-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

attB1 (fw): 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

attB4 (rw): 5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

attB3 (fw): 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGT-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

attB2 (rw): 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA-(~25 Genspezifische Nukleotide)-3'

BP-Reaktion/Klonierung des Entry-Vektors:

attB PCR Produkt (100 ng)	1,0 µl
Donor-Vektor (150 ng/µl)	1,0 µl
1x TE Buffer, pH 8,0	6,0 µl
BP Clonase II	2,0 µl

Für die 1-Fragmentklonierung wurde als Donor-Vektor pDONR221 benutzt, für eine LR-3-Fragmentklonierung die Vektoren pDONR221P1-P4, pDONR221P4r-P3r und pDONR221P3-P2.

Der Reaktionsansatz wurde mindestens 1 h bei 25°C inkubiert und im Anschluss zum Enzymverdau mit 1 µl Proteinase K 10 min bei 37°C behandelt. 1-2 µl des Reaktionsansatzes wurde durch Elektroporation (2.2.5.1) in DH10b-Zellen transformiert. Nach Plasmid-Isolation wurde das Konstrukt durch Sequenzierung überprüft. Der in der BP-Reaktion produzierte

Entry-Vektor wurde in der LR-Reaktion zur Klonierung des Expressionsvektors weiterverwendet.

LR-Reaktion/Klonierung des Expressionsvektors

(1-Fragmentklonierung):

Entry-Vektor (100 ng)	1,0 µl
Destination-Vektor (150 ng/µl)	1,0 µl
1x TE Buffer, pH 8,0	6,0 µl
LR Clonase II	2,0 µl

Die LR-3-Fragmentklonierung wurde zur Konstruktion von Fluorophor-gelabelten Proteinen verwendet.

Konstruktionsschema der Fluorophor-gelabelten Proteine:

N-terminal gelabeltes Protein:



C-terminal gelabeltes Protein:



Als Fluorophore wurden entweder YFP oder Cer verwendet, als Spacer wurde eine zufällig gewählte Nukleotidabfolge von 20-50 bp gewählt, wobei darauf geachtet wurde, dass an der angezeigten Stelle ein Stopcodon enthalten war und innerhalb der Nukleotide kein mögliches Startcodon.

LR-Reaktion/Klonierung des Expressionsvektors**(3-Fragmentklonierung):**

Entry-Vektor1 (100 ng)	0,5 µl
Entry-Vektor2 (100 ng)	0,5 µl
Entry-Vektor3 (100 ng)	0,5 µl
Destination-Vektor (150 ng/µl)	1,0 µl
1x TE Buffer, pH 8,0	5,5 µl
LR Clonase II Plus	2,0 µl

Als Destinationsvektoren wurden stets der Vektor pT-Rex-DEST30 für die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen oder zur Produktion von Adenoviren der Vektor pAd/CMV/V5-DEST eingesetzt. Die LR-Reaktion für die 1-Fragmentklonierung wurde 1 h bei 25°C, die LR-Reaktion für die 3-Fragmentklonierung ü. N. bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Proteinase K und einer zehnminütigen Inkubationszeit bei 37°C wurden 1-2 µl des Reaktionsansatzes in kompetente DH10b Zellen transformiert (2.2.5.1). Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Sequenzierung überprüft.

2.2.6 Proteinanalytik**2.2.6.1 Proteinpräparation aus Gewebe**

Zur Lysierung von Gewebe wurde der 2% SDS-Lysepuffer genutzt. Das gefrorene Gewebe wurde in den gekühlten Lysepuffer gegeben und auf Eis unter zwischenzeitlichem Abzentrifugieren homogenisiert (T10 basic ULTRA-TURRAX, Ika, Staufen, D). Die Lysate wurden mit 5% Benzonase (1/10 Verdünnung) 10 min bei RT inkubiert und im Anschluss für 5 min in Eiswasser im Ultraschallbad behandelt. Nach Zentrifugation (12000 g, 5 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Messung der Proteinkonzentration von Proben wurde der BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific (Bonn, D) verwendet. Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Eigenschaft von Proteinen, im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^{+} zu reduzieren. Das reduzierte Cu^{+} bildet mit Bichinonin-4-Carbonsäure (BCA) einen purpurfarbenen wasserlöslichen Chelat-Komplex, dessen Absorption bei 562 nm mit steigender Konzentration linear zunimmt (<http://www.piercenet.com>). Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte in Dreifachbestimmung. Es wurden 3x 20 µl einer geeigneten Probenverdünnung (Zelllysate 1/10, Gewebelysate 1/100 oder 1/200) sowie BCA Standards im Konzentrationsbereich 1000-62 µg/ml

BSA mit je 200 µl Reaktionslösung (Reagenz A / B = 50/1) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Vermessung der Absorption bei 562 nm (Infinite M200, Tecan, Crailsheim, D) wurde die Konzentration der Proben mit Hilfe einer BSA-Standardgeraden berechnet.

2.2.6.3 Western Blot

2.2.6.3.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen und Gelelektrophorese

Die Herstellung der Polyacrylamidgele und die anschließende Gelelektrophorese erfolgte mittels des Mini PROTEAN®-System (BIO-RAD, München, D). Falls nicht anders erwähnt, wurden 10% und 12% Gele genutzt.

Folgende Zusammensetzungen wurden für die Sammel- und Trenngel verwendet:

Substanz	Sammelgel	Trenngel	
		10%	12%
Rotiporese Gel 30	0,5 ml	5,0 ml	6,0 ml
Puffer für Sammelgel	1,25 ml	-	-
Puffer für Trenngel	-	3,8 ml	3,8 ml
ddH ₂ O	3,2 ml	3,7 ml	2,6 ml
Glycerol	-	2,5 ml	2,5 ml
TEMED	6,0 µl	12,0 µl	12,0 µl
APS (10%)	48,0 µl	72,0 µl	72,0 µl

Unmittelbar nach Zugabe des Radikalbildners APS zu der Trenngellösung wurde diese zügig zwischen die zuvor vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit 70% EtOH überschichtet. Nach vollendeter Polymerisation wurde der 70% EtOH entfernt und das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet. Bevor die Polymerisierung einsetzte, wurde der gewünschte Taschenformer in das noch flüssige Sammelgel inseriert.

Vor Gelbeladung wurden die Proben mit der entsprechenden Menge Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgekocht. Das Aufkochen in SDS-haltigem Ladepuffer bewirkte eine Auffaltung und gleichmäßige Absättigung der Polypeptidketten mit negativer Ladung. Dadurch wurde die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nicht durch ihre Eigenladung sondern in erster Linie durch ihr Molekulargewicht bestimmt. Nach Zentrifugation (1 min, 12000 g) wurden die denaturierten Proteinproben zusammen mit 7 µl vorgefärbtem Protein-Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot, D) auf das Gel geladen und die elektrophoretische Auftrennung gestartet (50 mA, 1,5 h).

2.2.6.3.2 Membrantransfer und Proteindetektion

Die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore, Schwalbach, D) wurde entweder im Nassblotverfahren (Mini PROTEAN® System, BIO-RAD,

München, D) oder mit einer „Semi-dry“-Blotapparatur (GE Healthcare, Freiburg, D) durchgeführt. Die Membran wurde vor dem Proteintransfer 5 min in 100% MeOH und weitere 10 min in Transferpuffer equilibriert. Direkt im Anschluss an die Elektrophorese wurde das PAGE-Gel vorsichtig unter Luftblasenausschluss und ständigem Befeuchten mit Transferpuffer auf die equilibrierte Membran gelegt. Im Fall des Nassblotverfahrens erfolgte der Transfer zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Blättern Papier (Whatman® 3 MM 1,3 mm Stärke), die wiederum zwischen zwei Schwämmen in die vorgesehene Halterung eingebracht wurden. Im „Semi-dry“-Verfahren wurde eine „Sandwich“-Kombination aus sechs transferpufferdurchtränkten Blättern Whatman® Papier gebildet, wobei Membran und Gel zwischen je drei Blättern Papier platziert wurden. Geblottet wurde in den entsprechenden Vorrichtungen bei 10 V für 2 h, wobei beim Nassblotverfahren zur Kühlung ein Kühlaggregat in die Kammer gegeben wurde. Nach vollendetem Proteintransfer wurde die Membran für mindestens 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C standardmäßig in Milch-Blockingpuffer inkubiert. Wurde ein phosphorspezifischer Antikörper zur Detektion verwendet, wurde BSA-Blockpuffer verwendet, um eine unspezifische Bindung des Phosphorantikörper an das im Milchpuder enthaltene Phosphorprotein Casein zu vermeiden. Der Blockpuffer wurde verworfen und die geblockte Membran für mindestens 1 h oder ü. N. mit der entsprechenden Erstantikörperverdünnung (Verdünnung in zuvor gewähltem Blockpuffer) inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte für jeweils 5 min. Bei dem Standardwaschpuffer handelte es sich um PBST, im Fall eines phosphorspezifischen Erstantikörpers wurde mit BSA-Waschpuffer gewaschen. Die nachfolgende Inkubation der Membran in der Zweitantikörperverdünnung (standardmäßig PBST, für phosphorspezifischen Erstantikörper in BSA-Waschpuffer) wurde ebenfalls für mindestens 1 h vorgenommen. Nach erneutem Waschzyklus in dem entsprechenden Waschpuffer wurde die Membran mit ECL Plus (laut Angabe des Herstellers; GE Healthcare, Freiburg, D) entwickelt und die Proteinbanden mit dem Gerät LAS 4000 Mini detektiert (Fujifilm, Düsseldorf, D).

2.2.6.4 Strippen von Western Blot-Membranen

Die Entfernung des Erst- und Zweitantikörpers von einer Western Blot-Membran wurde in Anlehnung an das Abcam Stripping-Protokoll (http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=popular_protocols) durchgeführt. Die Membran wurde 2x für 10 min in Stripping-Puffer inkubiert, und anschließend jeweils 2x mit PBS und 2x mit PBST gewaschen. Die Membran wurde erneut für mindestens 1 h geblockt, bevor mit der erneuten Antikörperinkubation fortgefahren wurde.

2.2.6.5 Proteinvisualisierung mittels Silberfärbung

Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine Methode zur Färbung von Polyacrylamid-Gelen⁸¹. Das Prinzip der Färbung beruht auf der Reduktion von proteingebundenen Ag^+ -Ionen zu elementarem Silber, das als schwarze Färbung im Gel sichtbar wird. In der vorangegangenen SDS-Page für die Silberfärbung wurden abweichend von 2.2.6.3 stets 10% NuPAGE precast BisTris Gele (Invitrogen, Karlsruhe, D) verwendet, die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS Laufpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, D).

Tabelle 2.2.3.5.1: Färbeprotokoll nach Blum et al.

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixierung	Fixierlösung 40% EtOH 10% Essigsäure	> 1 h
Waschen	30% EtOH ddH ₂ O	2x 20 min 1x 20 min
Sensibilisierung	0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1x 1 min
Waschen	ddH ₂ O	3x 20 sek
Färbung	0,1% AgNO_3 , 4°C	20 min
Waschen	ddH ₂ O	3x 20 sek
Gelkammer wechseln		
Waschen	ddH ₂ O	1x 1 min
Entwicklung	3% Na_2CO_3 0,05% Formaldehyd	1-3 min
Waschen	ddH ₂ O	1x 20 sek
Abstoppen	0,05 M EDTA	1x 30 min

2.2.6.6 Herstellung eines pS37-phosphorylierungsspezifischen Antikörpers

Zur Herstellung des phosphorylierungsspezifischen Antikörpers wurden vier Kaninchen mit einem S37-phosphorylierungsstellenidentischen Peptid immunisiert. Die Peptidsynthese, Immunisierung und Aufreinigung, ebenso wie der in 3.2.1 dargestellte Dot-Blot wurde von Prof. Dr. Stefan Schulz und der Firma Gramsch Laboratories (Schwabhausen, D) übernommen. Serum Nummer 2185 erkannte das phosphorylierte Serin 37 am spezifischsten und wurde in dieser Arbeit als pS37-Antikörper verwendet.

2.2.6.7 Dephosphorylierung von Proteinen nach Membrantransfer

Um die Spezifität des phosphorylierungsspezifischen Antikörpers (pS37, MYOZ2) zu testen, wurde eine Dephosphorylierung von Proteinen nach Membrantransfer durchgeführt. Orientiert wurde sich bei der Versuchsdurchführung an einem Abcam Protokoll (Protokoll: *determining if the antibody binds only phosphorylated proteins*) (http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=popular_protocols). Es wurde ein Duplikat

von 30 µg (-)-Isoprenalin HCL- oder (±)-Propranolol HCL-behandelter Mausherzen nach elektrophoretischer Auftrennung (2.2.6.3) auf einem gemeinsamen SDS-Gel auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde zwischen den jeweiligen Duplikaten geteilt und die beiden Membranteile einzeln ü. N. bei 37°C unter leichtem Schütteln in 20 ml CIP-Puffer inkubiert. Der Puffer für ein Membranstück wurde vor Inkubation mit 200 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) versetzt. Abschließend wurde 3x mit PBST gewaschen und für 1 h in 5% BSA in PBST geblockt. Es folgte die Detektion mit dem pS37-MYOZ2 Antikörper.

2.2.6.8 Expression und Detektion von Proteinen im zellfreien System

2.2.6.8.1 Expression

Zur *in vitro* Transkription und Translation von Proteinen wurde der TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System-Kit (Promega, Mannheim, D) genutzt. Gemäß dem Herstellerprotokoll erfolgte die Expression rekombinaten Proteins in einem Kaninchen-Retikulozyten Lysat mit Hilfe einer T7-RNA Polymerase (200 µl TNT Quick Master Mix, 1,5 µg Plasmid DNA, 12 µl [³⁵S] L-Methionin (10 mCi/ml), 90 min, 30°C). Die kodierenden Sequenzen der Proteine befanden sich alle in dem Vektor pcDNA3.1(+) unter der Kontrolle eines T7-Promotors.

2.2.6.8.2 Visualisierung

Die Visualisierung der rekombinaten Proteine erfolgte nach Einbau von radioaktiv markiertem [³⁵S] L-Methionin mittels autoradiographischer Detektion nach SDS-Page (2.2.6.3). Das SDS-Gel wurde nach elektrophoretischer Auftrennung für 30 min in saurer 30% EtOH-Lösung (30% EtOH, 10% Essigsäure, 60% ddH₂O) unter Schütteln inkubiert, anschließend weitere 30 min in Amplifizierungslösung (NAMP100V Amplify, GE Healthcare, Freiburg, D). Das Gel wurde 40 min bei 80°C unter Vakuum (Gel Dryer, Model 583, BIO-RAD, München, D) getrocknet. Die autoradiographische Detektion (Cyclone Plus Phosphor Imager, PerkinElmer, Rodgau D) wurde nach Auflage der Phosphor-Imager Platten (ein bis fünf Tage) vorgenommen.

2.2.6.9 Co-Immunopräzipitation (CoIP) von Proteinen

Zur Untersuchung von Protein-Interaktionen wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente (CoIP) durchgeführt.

2.2.6.9.1 CoIP von transfizierten Zellen

HEK 293-Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit CoIP-Lysis-Puffer versetzt, auf Eis abgeschabt und sonifiziert (Sonoplus, Bandelin, Berlin, D). Nach Zentrifugation (5 min, 12000

g, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration (2.2.6.2) bestimmt. Vor Präzipitation erfolgte eine Inkubation des jeweiligen Antikörpers (in der Regel 3 µg Antikörper/50 µl Beads) mit magnetischen Dynabeads®-Protein G (Invitrogen, Karlsruhe, D, GPM1-CoIP-Experimente) oder mit Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg, D, MYO2-CoIP-Experimente). Zur Bindung des Antikörpers an das Protein G wurden 50 µl Slurry 1x mit 0,05% PBST gewaschen, im Fall der magnetischen Dynabeads mittels des DynaMag™-Spin Magnet (Invitrogen, Karlsruhe, D). Die Beladung der Beads mit Antikörper wurde in 200 µl PBST 0,05% unter Rotation (Intelli-Mixer RM-2, LTF Labortechnik, Wasserburg, D) bei 4°C für mindestens 3 h oder ü. N. durchgeführt. Danach wurde der Überstand abgenommen und überschüssiger, ungebundener Antikörper durch vorsichtiges Waschen der Beads mit 300 µl 0,05% PBST entfernt. Unmittelbar darauf fand die Inkubation des Proteinlysates mit den Beads statt. Es wurden mindestens 200 µg, maximal 500 µg Protein auf die Beads gegeben. Falls das Volumen 200 µl unterschritt, wurde mit CoIP-Lysis Puffer auf 200 µl-Gesamtvolumen ergänzt. Als Kontrolle wurden Beads ohne Antikörper mit Proteinlysate inkubiert. Die Antikörper-Proteinbindung erfolgte durch Rotation bei 4°C für mindestens 2 h oder ü. N.. Nach vollendeter Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Beads vorsichtig 4x mit 350 µl 0,05% PBST gewaschen. Die Beads wurden mit 25 µl 2x Protein-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Dies löste die Antikörper-Protein G-Bindung was eine nachfolgende Analyse der Proteine mittels SDS-PAGE (2.2.6.3) erlaubte.

2.2.6.9.2 CoIP von rekombinant exprimierten Proteinen

Zur Analyse von Proteininteraktionen rekombinant exprimierter Proteine wurden je 3 µl Expressionsansatz der jeweiligen Proteine gemischt und in TNT CoIP-Puffer (ad 50 µl) für 1,5-3 h bei RT inkubiert. Die Antikörperbeladung der Beads, die Protein-Beads-Inkubation und die jeweiligen Waschschrte erfolgten analog zu 2.2.6.9.1, allerdings in TNT-CoIP-Puffer. Die Analyse der Proteine erfolgte gemäß 2.2.6.9.1.

2.2.6.10 Subzelluläre Fraktionierung von Zellen

Um die Lokalisation einzelner Proteine innerhalb der Zelle genauer zu untersuchen, wurde das Gesamtproteom der Zelle in vier Subfraktionen getrennt isoliert. Dafür wurde gemäß den Herstellerangaben der ProteoExtract® Subzelluläre Proteome Extraction Kit (Merck, Darmstadt, D) verwendet. Nachdem die Zellen 2x 5 min mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen worden waren, wurden durch Zugabe von Extraktionspuffer I (10 min, 4°C, unter leichtem Schütteln) die zytosolischen Proteine extrahiert. Die Extraktion von Membranen und membranhaltigen Organellen erfolgte durch die Zugabe von Extraktionspuffer II, mit

dem die Zellen 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert wurden. Kernproteine wurden mit Puffer III (10 min bei 4°C, leichtes Schütteln) isoliert. Die verbleibenden Proteine des Cytoskeletts wurden durch Zugabe von Extraktionspuffer IV bei RT in Lösung gebracht. Die Analyse der Fraktionen fand mittels SDS-Page statt (2.2.6.3).

2.2.6.11 *In vitro* Phosphorylierung

Zur Überprüfung der stimulationsabhängigen Phosphorylierung des GPSM1 in isolierten neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) wurde eine *in vitro* Phosphorylierung durchgeführt. In fünf Wells einer 6-Well-Zellkulturschale wurden jeweils drei Millionen NRCM/Well in 5% NRCM-Kulturmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Infektion der NRCM (zwei Well GPSM1 S567-HA, zwei Well GPSM1 S567A-HA, ein Well uninfiziert) mit *ifu* (*infectious units*)=30. 24 h nach Infektion wurde das Medium mit 5% phosphatfreiem DMEM (GIBCO, Karlsruhe, D; 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% BRDU) erneuert. 10 h später wurde 1x mit 1% phosphatfreiem DMEM (1% dialysiertem FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% BRDU) gewaschen, wobei das FCS durch dialysiertes, phosphatfreies FCS (GIBCO, Karlsruhe, D) ersetzt wurde. Die Zellen wurden daraufhin in 1% phosphatfreiem DMEM (1% dialysiertem FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% BRDU) ü. N. inkubiert. Nach 24 h wurde 1x mit 0,1% phosphatfreiem DMEM (0.1% dialysiertem FCS 1%, Penicillin/Streptomycin, 1% BRDU) gewaschen und jedes Well mit 3 ml 0,1% phosphatfreiem DMEM (0.1% dialysiertem FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% BRDU) und 200 µCi/Well radioaktiven [³²P] (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D) versetzt. Die Zellen wurden für 3 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine fünfminütige Stimulation der Zellen mit 10 µM Forskolin wobei jeweils ein Well der GPSM1 S567-HA-NRCM und ein Well GPSM1 S567A-HA-NRCM unstimuliert blieben. Zügig wurde mit 1 ml eiskaltem PBS/Well gewaschen und jedes Well mit 500 µl IP-Puffer 10 min auf Eis lysiert. Die Zelllysate wurden abgeschabt und 5 min bei 4°C und 10000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils auf 50 µl Dynabeads®-Protein G (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben, die zuvor mit 3,5 µl HA.11 Antikörper (HISS Diagnostics, Freiburg, D) abgesättigt worden waren. Die Immunopräzipitation (IP) der HA-gelabelten Konstrukte wurde analog zu 2.2.6.9 durchgeführt. 2 µl des IP-Protein-Eluates wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Für die Detektion wurde der Cyclone Plus Phosphor Imager (PerkinElmer, Rodgau, D) genutzt.

2.2.6.12 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Fluoreszenz-Immunhistochemie wurden Zellen auf sterile beschichtete Glasdeckgläser (Poly-D-Lysine, im Dunkeln, 1 h) in eine Zellkulturplatte oder direkt in eine 96-Well-Platten mit optischem Boden (Ibidi, Martinsried, D) ausgesät. Vor Fixierung wurden die Zellen 1x mit 1x PBS gewaschen und mit 4% PFA für 5 min bei 4°C fixiert. Nach drei weiteren 1x PBS-Waschschritten wurde die Zellmembran mit 0,2% Triton-X (verdünnt in 1x PBS) für 5 min bei RT permeabilisiert. Es wurde nochmals 3x mit 1x PBS gewaschen, danach mit der Erstantikörper-Verdünnung in 1x PBS für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 1x PBS erfolgte die Bindung des Zweitantikörpers (verdünnt in 1x PBS), ebenfalls für 1 h bei 37°C. Überschüssiger Zweitantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt und die Deckgläser mit Vectashield-Dapi eingedeckelt. Die Zellen der 96-Well-Platte wurden mit 200 µl sterilem 50%-Glycerol (verdünnt in 1x PBS) überschichtet und die Platte mit einer Silberklebefolie versiegelt. Die gefärbten Zellen wurden mit unterschiedlichen Objektiven (Zeiss, Jena, D) mit folgendem Mikroskopie-System aufgenommen: AxioObserver.Z1 (Zeiss, Jena, D), motorisierter Mikroskoptisch (130x85; Märzhäuser, Wetzlar, D), Lumen200 (Prior, Cambridge, GB) und Retiga-4000DC CCD Kamera (QImaging, Surrey, Kanada).

2.2.7 Zellkultur

2.2.7.1 Kultivierung von Zelllinien und primären Zellen

Human Embryonic Kidney (HEK) 293-Zellen wurden bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank in DMEM⁺⁺⁺ (GIBCO, Karlsruhe, D, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 10% FCS) als Kultivierungsmedium gehalten. Zur Passagierung der HEK 293-Zellen wurde Trypsin EDTA verwendet.

Die Kultivierung primärer neonataler Rattenkardiomyozyten fand bei 37°C unter 1% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank statt. Die Aussaat der Zellen wurde direkt im Anschluss der Zell-Präparation (2.2.7.2) vorgenommen. Als Zellkulturmedium wurde NRCM-Kulturmedium für Kardiomyozyten mit versuchabhängig variierenden Konzentrationen an FCS (0%, 1%, 5%, 10%) verwendet.

Zur Bestimmung der Zellenzahl wurde der *Countess Cell Counter* (Invitrogen, Karlsruhe, D) benutzt und eine Mischung aus 20 µl Zellsuspension und 20 µl Trypan Blau (GIBCO, Karlsruhe, D) in die Zellzählkammer gegeben. Die gewünschte Zellzahl wurde mit DMEM⁺⁺⁺- bzw. NRCM-Kulturmedium auf ein geeignetes Volumen verdünnt und auf die entsprechenden Zellkulturschalen verteilt.

2.2.7.2 Isolation primärer neonataler Kardiomyozyten

Die Isolation von primären Zellen aus neonatalen Rattenherzen erfolgte durch enzymatischen Verdau unter sterilen Bedingungen. Die Herzen von 1-2 Tage alten Sprague Dawley Ratten wurden unter der Sterilbank entnommen und in eine 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml CBFHH auf Eis überführt. Die Vorhöfe der Herzen wurden entfernt und die Herzen nach einem weiteren Waschschrift in CBFHH in einer leeren 6 cm Zellkulturschale in kleine Stücke geschnitten. Mit 15 ml vorgewärmter Trypsinlösung wurden die zerkleinerten Herzen mit einer Weithalspipette in ein 100 ml Becherglas transferiert und auf dem Magnetrührer für 15min bei RT gerührt. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebe in frischer Trypsinlösung (20 ml) für weitere 10 min unter Rühren inkubiert. Es wurde vorsichtig 10x auf- und abpipettiert und der Überstand in ein 50 ml Falcon überführt, das 7,5 ml FCS enthielt und bei 37°C warm gehalten wurde. Diese Prozedur wurde bis zum vollständigen Verdau der Herzen wiederholt. Die Zellen wurden 10 min bei 800 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml NRCM-*Preplating*-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch einen *cell strainer* (40 µm Porengröße; BD, Heidelberg, D) filtriert und mit weiteren 10 ml NRCM-*Preplating*-Medium versetzt. Je 10 ml des Filtrats wurde auf eine 10 cm Zellkulturschale gegeben und 1 h bei 37°C und 1% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit fand die Adhäsion der Fibroblasten statt, wohingegen die Kardiomyozyten im Überstand verblieben. Der Überstand mit den Kardiomyozyten wurde abgenommen, in ein neues 50 ml Falcon überführt und die Zellzahl bestimmt (Countess Cell Counter, Invitrogen, Karlsruhe, D). Die gewünschte Zellzahl wurde anschließend in einer geeigneten Verdünnung in NRCM-Kulturmedium auf Zellkulturschalen ausgesät und bei 37°C in 1% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.7.3 Produktion und Titrierung von Adenoviren

In dieser Arbeit verwendete Viren wurden mit Ausnahme des β_1 -adrenergen Rezeptor-Virus (Spezies: Mensch; Bezugsquelle: Lehrstuhl für Pharmakologie, Universität Würzburg, D) selbst hergestellt.

2.2.7.3.1 Adenovirusproduktion

Zur Produktion von Adenoviren wurde das gewünschte Konstrukt mit der GATEWAY-Technologie (2.2.5.11) in den pAd/CMV/V5-DEST Vektor inseriert. 10 µg der gereinigten Plasmid-DNA wurden mit dem Restriktionsenzym PacI verdaut (2.2.5.4) und die verdaute DNA durch eine EtOH-Fällung aufgereinigt (2.2.5.9). 1 µl des gefällten DNA-Verdaus wurde als Verdaukontrolle elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt (2.2.5.5). 2 µg des aufge-

reinigten Verdaus wurden zur Transfektion einer 6 cm Zellkulturschale von HEK 293-Zellen gemäß dem Effectene Transfektionsprotokoll (2.2.7.5) verwendet.

10-13 Tage nach Transfektion war eine erste Plaquebildung zu beobachten. Nachdem sich 90% der Zellen von der Platte gelöst hatten, erfolgte der 1. von drei Amplifikationsschritten. Hierfür wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und 10 min bei 4°C und 850 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml sterilem 10 mM Tris pH 8,0 resuspendiert. Zur Zelllyse und Freisetzung der Viruspartikel wurden drei Gefrier-Tauzyklen durchgeführt. Für jeden Zyklus wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Abschluss des 3. Zyklus wurde zentrifugiert (850 g, 10 min, 4°C) und der Überstand in 2x 500 µl Aliquots (Lagerung bei -80°C) aufgeteilt.

Für die 2. Amplifikation wurde eine 10 cm Zellkulturschale mit 90% konfluenten HEK 293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit 500 µl der 1. Amplifikation infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Plaquebildung (typischerweise 2-3 Tage nach Infektion) wurde der Überstand in ein 50 ml Falcon überführt und abzentrifugiert (850 g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 2 ml sterilem 10 mM Tris pH 8,0 resuspendiert und ebenfalls drei Gefrier-Tauzyklen unterzogen. Nach Zentrifugation (850 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in 600 µl Aliquots aufgeteilt, die bei -80°C gelagert wurden.

Zur 3. Amplifikation wurden sechs 15 cm Zellkulturschalen mit 90% konfluenten HEK 293-Zellen vorbereitet und jede Platte mit 100 µl der 2. Amplifikation infiziert. In der Regel konnte zwei Tage nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ eine Plaquebildung beobachtet werden. Der Überstand der sechs Platten wurde vereinigt und abzentrifugiert (850 g, 10 min, 4°C). Nach Resuspension des Zellpellets in 3 ml sterilem 10 mM Tris pH 8,0 wurden die Viruspartikel wieder durch Gefrier-Tauzyklen freigesetzt. Der zentrifugierte Überstand wurde abschließend in 100 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.7.3.2 Titrierung

Zur Bestimmung des Virustiter wurde der Adeno-X RapidTiter Kit (Clontech, Heidelberg, D) benutzt. Gemäß den Herstellerangaben wurde eine Virusverdünnungsreihe (10⁻²-10⁻⁶) in DMEM⁺⁺⁺ Medium vorbereitet. Anschließend wurde 1ml Zellverdünnung (5x10⁵ HEK 293 Zelle/ml) in jedes Well einer 12-Well-Platte gegeben und dieser Zellsuspension 100 µl der einzelnen Virusverdünnungen zugesetzt. Ein Well diente als Negativkontrolle und blieb uninfiziert. Die Zellen wurden 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Fixierung der Zellen in 100% MeOH (10 min bei -20°C) wurde die Platte 3x mit 1% BSA in PBS gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 0,5 ml/Well Maus-anti-Hexon Antikörper (1/1000, in

1% BSA in PBS) bei 37°C. Nach drei Waschschritten mit 1% BSA in PBS fand eine einstündige Inkubation mit dem Ratte-anti-Maus-HRP Antikörper (1/500, in 1% BSA in PBS, 0,5ml/Well) bei 37°C statt. Daraufhin wurden 0,5 ml DAB-Arbeitslösung (10x DAB Substrat 1:10 mit 1x Peroxidase Puffer) in die zuvor 3x mit 1% BSA in PBS gewaschenen Wells gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Arbeitslösung wurde entfernt und jedes Well mit 1 ml PBS vor dem Austrocknen geschützt.

Die Auszählung der *ifu* (*infectious units*)/ml basierte auf folgender Formel:

$$(\text{Infizierte Zellen/Feld}) \times (\text{Felder/Well}) / \text{Virusvolumen} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Es wurden lediglich Virusverdünnungen mit mehr als 10% positiven Zellen gezählt, für jede Titerberechnung zehn verschiedene Felder/Well.

2.2.7.4 Infektion von primären Kardiomyozyten

Zur Expression von Proteinen in NRCM wurden die Zellen in der Regel einen Tag nach Zellisolation infiziert. Die Zellen wurden 1x mit vorgewärmten PBS gewaschen, um Verunreinigungen aus abgestorbenen Zellen und Zellbruchstücken zu entfernen. Die zuvor im passenden Kulturmedium vorbereitete Viruspartikelverdünnung wurde in einem nächsten Schritt vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C in 1% CO₂ inkubiert. Für die FRET-Experimente wurde die Zellen (abhängig von der Zellqualität) mit durchschnittlich ifu=50 für die jeweiligen Goloco/GPSM1-Cer-Konstrukte und ifu=125 für Gαi-YFP infiziert.

2.2.7.5 Transfektion von Zellen

Alle Transfektionen von HEK 293-Zellen erfolgte mit Effectene-Transfektionsreagenz (Qia-gen, Hilden, D). In Anlehnung an das Herstellerprotokoll wurde die gereinigte DNA in Puffer EC verdünnt, mit Enhancer versetzt und nach Vortexen 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die entsprechende Menge an Effectene-Transfektionsreagenz zugegeben, gemischt und zur Transfektionskomplex-Formation 10 min bei RT inkubiert. Eine passende Menge an DMEM⁺⁺⁺ wurde dem Transfektionsansatz zugesetzt und vorsichtig gemischt. Tropfenweise wurde diese Mischung auf 50-60% konfluente Zellen gegeben, deren Medium zuvor erneuert worden war. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 48 h zur Proteinexpression gehalten.

Zur Transfektion von NRCM wurde LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, D) laut den Angaben des Herstellers verwendet. Die Transfektion erfolgte in Antibiotika-freiem 5% NRCM-Kulturmedium, die Inkubation der Plasmid-DNA mit LipofectamineTM 2000 in Opti-

MEM I (GIBCO, Karlsruhe, D). 4-6 h nach Transfektion wurde das Medium durch Antibiotikahaltiges 5% NRCM-Kulturmedium ersetzt und die Zellen weitere 48 h zur Proteinexpression inkubiert.

2.2.8 Reporter-Gen-Assay

Zur Untersuchung der Calcineurin-Aktivität wurde ein Reporter-Gen-System verwendet, welches in Abhängigkeit der Aktivität des Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) das Reporter-Enzym Luciferase exprimiert⁸² (Abb. 14).

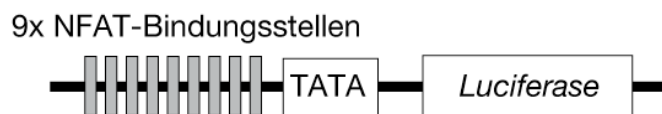


Abbildung 14: Schema des NFAT-Reporter-Gen-Konstrukts, modifiziert nach Ref.⁸². Im dephosphorylierten Zustand lokalisiert NFAT im Zellkern, was die Bindung an das Reporter-Konstrukt ermöglicht und die Expression der Luciferase zur Folge hat.

Zur Bestimmung der NFAT-Luciferase Aktivität wurden 200.000 NRCM/Well in eine 48-Well-Platte (4 Wells/Bedingung) in 5% NRCM-Kulturmedium ausgesät. Nach 5 h erfolgte die Infektion der Zellen mit den jeweiligen Konstrukten. Die Transfektion des Luciferase Reporter-plasmids erfolgte 12 h nach Aussaat der Zellen (2.2.7.5). 24 h später wurden die Zellen für 24 h mit 10 μ M Angiotensin II stimuliert. Zur Detektion der Luciferase-Aktivität wurde das Luciferase Assay System (Promega, Mannheim, D) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 70 μ l 1x Cell Culture Lysis Reagent versetzt. Die Überstände wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert. Jeweils 10 μ l Überstand wurde mit 50 μ l Luciferase Reagenz versetzt und vermessen (Infinite M200, Tecan, Crailsheim, D). Die Messergebnisse wurden auf die jeweilige Proteinkonzentration normalisiert.

2.2.9 Intermolekularer Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist ein distanzabhängiger Prozess der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei Fluorophoren⁸³. Das angeregte Fluorophor, Donor genannt, überträgt einen Teil seiner Energie auf einen zweiten Fluorophor, den Akzeptor. Dieser Energietransfer ist möglich, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (> 30%) überlappt und beide Fluorophore sich in enger Nachbarschaft zueinander befinden (< 10nm).

Für die FRET-Messungen wurde Cerulean (Cer) als Donor und YFP (*yellow fluorescent protein*) als Akzeptormolekül gewählt. Die Anregung des Cer erfolgte bei 436 nm, was zu einer Lichtemission bei 480 nm führte (Abb. 15 (A)). Befand sich ein YFP-Molekül in unmittelbarer Nähe des Cer, wurde die Emission des Cer bei 480 nm verringert, da eine direkte Energieübertragung auf das YFP stattfand (Abb. 15 (B)). Dieser Energietransfer konnte als Lichtemission des YFP-Moleküls bei 535 nm gemessen werden.



Abbildung 15: Schematische Darstellung des FRET. Befinden sich beide Fluorophore in einem Abstand > 10 nm zueinander, kann keine Energieübertragung stattfinden (A). Bei einem Abstand von < 10 nm findet eine Energieübertragung von Cer auf YFP statt (B).

Die FRET-Messung in lebenden, intakten Zellen ermöglicht eine Echtzeitbeobachtung von Änderungen in intra- oder intermolekularen Interaktionen, wobei sowohl zeitliche als auch räumliche Informationen erhalten werden können⁸⁴. Zur Bestimmung des FRET-Signals wurde zu jedem Zeitpunkt die Intensität der Donor-Emission ($480 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$) und der Akzeptor-Emission ($535 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$) bei einer Anregung von $436 \text{ nm} (\pm 10 \text{ nm})$ bestimmt und daraus das Emissionsverhältnis gebildet (Akzeptor/Donor-Emission). Eine Änderung dieser Ratio zeigte eine Veränderung des molekularen Arrangements der Fluorophore an. So bedeutete eine Verringerung der Ratio eine räumliche Entfernung beider Fluorophore, wohingegen ein Ratio-Anstieg eine Distanzverringerung zwischen den beiden Fluorophoren beinhaltete. Durch die spektrale Überlappung der Emission von Donor und Akzeptor kam es zu einem Cer-Übertragungseffekt. Um den Anteil der Cer-Emission am YFP-Signal zu bestimmen, wurden Zellen, die nur den Cer-Sensor enthielten, gemessen. Die Emissions-Ratio aus YFP/Cer wurde von mehreren Zellen bestimmt und der Mittelwert daraus zur Berechnung des Korrekturfaktors gebildet. Mit diesem Faktor wurde die YFP Emission folgendermaßen korrigiert:

$$YFP_{\text{korrigiert}} = YFP_{535\text{nm}} - \text{Faktor} \times Cer_{480\text{nm}}$$

Das korrigierte $YFP_{\text{korrigiert}}$ wurde zur Berechnung der FRET-Ratio verwendet.

HEK 293-Zellen zur FRET-Messung wurden auf sterile Glasdeckgläser in 6-Well Petrischalen gesplittet, die zuvor 1 h mit Poly-D-Lysine unter Lichtausschluss beschichtet worden waren. 24 h später erfolgte die Transfektion der Zellen (2.2.7.5), 48-72 h nach Transfektion die FRET-Messung. NRCM wurden ebenfalls auf Poly-D-Lysine beschichtete Glasdeckgläser ausgesät und nach 24 h mit den entsprechenden Konstrukten infiziert. Nach weiteren 48 h fand die FRET-Messung der Zellen statt. Folgende Konzentrationen der jeweiligen Liganden wurden verwendet: 100 μM 8-Bromo-cAMP, 300 μM Carbachol, 10 μM Clonidin, 10 μM Forskolin, 10 μM Isoprenalin, 2 μM Noradrenalin.

Die Messung wurde an einem inversen Mikroskop (AxioObserver, Zeiss, Jena, D) mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv bei RT durchgeführt. Das Deckglas mit den adhären Zellen wurde in eine Deckglashalterung eingebracht und die Zellen vorsichtig mit vorgewärmtem FRET-Puffer bedeckt. Zur Untersuchung von Rezeptor-Liganden-vermittelten Änderungen im FRET-Signal wurden die Zellen kontinuierlich mit Hilfe einer computergesteuerten Perfusionsvorrichtung (ALA VC3-8, ALA Science Instruments, Farmingdale, USA) mit FRET-Puffer überspült. Nachdem sich eine stabile Basisratio eingestellt hatte, wurde der jeweilige Ligand als FRET-Pufferverdünnung ebenfalls über die Perfusionsvorrichtung auf die Zellen appliziert. Die Emission von YFP und Cer wurde mittels eines Strahlenteilers (Dual View DV2, Decon Science Tec, Hohengandern, D) geteilt, das Signal mit einer „evolve“-EM 512 Digitalkamera (Visitron, Puchheim, D) aufgenommen und durch das Programm Metafluor visualisiert. Zum Akzeptor-Photobleichen wurde ein Photodiodensystem (Till Photonics, Gräfelfing, D) verwendet. Die Aufzeichnung der jeweiligen Intensitäten erfolgte mit dem Programm Clampex 10.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Zuerst wurden die Intensitäten beider Fluorophore bei 436nm aufgezeichnet und anschließend für 5 min bei 490 nm das Akzeptor-Photobleichen durchgeführt. Daraufhin wurden wieder die Intensitäten beider Fluorophore bei 436 nm bestimmt.

2.2.10 Statistische Auswertung

Zur statistische Analyse der Ergebnisse wurde das *Prism Software Packet* (GraphPad, San Diego, USA) benutzt. Die Ergebnisse von Mehrfachbestimmungen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Zur Überprüfung statistischer Signifikanz wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, gefolgt vom Bonferroni-Test. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $P < 0,05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Massenspektrometrische Analyse des murinen kardialen Phosphoproteoms

3.1.1 Stimulation β -adrenerger Rezeptoren *in vivo*

Zur differenziellen Analyse des murinen kardialen Phosphoproteoms wurden Mäuse mit (-)-Isoprenalin HCL oder (\pm)-Propranolol HCL injiziert. Die Stimulationsdauer vor Entnahme des linken Ventrikels (LV) betrug für Isoprenalin nach Injektion 2 min. Innerhalb dieses Zeitraumes konnte in der Echokardiographie der LV-Funktion eine deutliche Steigerung der kardialen Kontraktilität beobachtet werden, die bereits nach 2 min wieder abklang. Die Kontrollgruppe wurde vor Entnahme des LV 5 h mit Propranolol behandelt, um innerhalb dieses Zeitraumes eine β AR-vermittelte Phosphorylierung zu verhindern und zugleich eine Dephosphorylierung bereits vorhandener Phosphorylierungsstellen zu erreichen.

Mittels Echokardiographie wurden ausgewählte Parameter der linksventrikulären Funktion bestimmt, welche als Indikatoren β -adrenerger Aktivität gewertet wurden. Abbildung 16 zeigt jeweils einen Ausschnitt des LV von Mäusen, die entweder nicht behandelt (vor Injektion) oder mit Propranolol oder Isoprenalin injiziert wurden. Gut zu erkennen ist die erhöhte Schlagkraft des Herzens nach zweiminütiger Stimulation mit Isoprenalin verglichen mit der fünfstündigen Propranolol-Behandlung. Die Auswertung der funktionellen Parameter (Auswurfraction (EF) und der Herzfrequenz (Schläge pro Minute)) zeigt eine deutlich gesteigerte Funktion des LV nach Stimulation mit Isoprenalin.

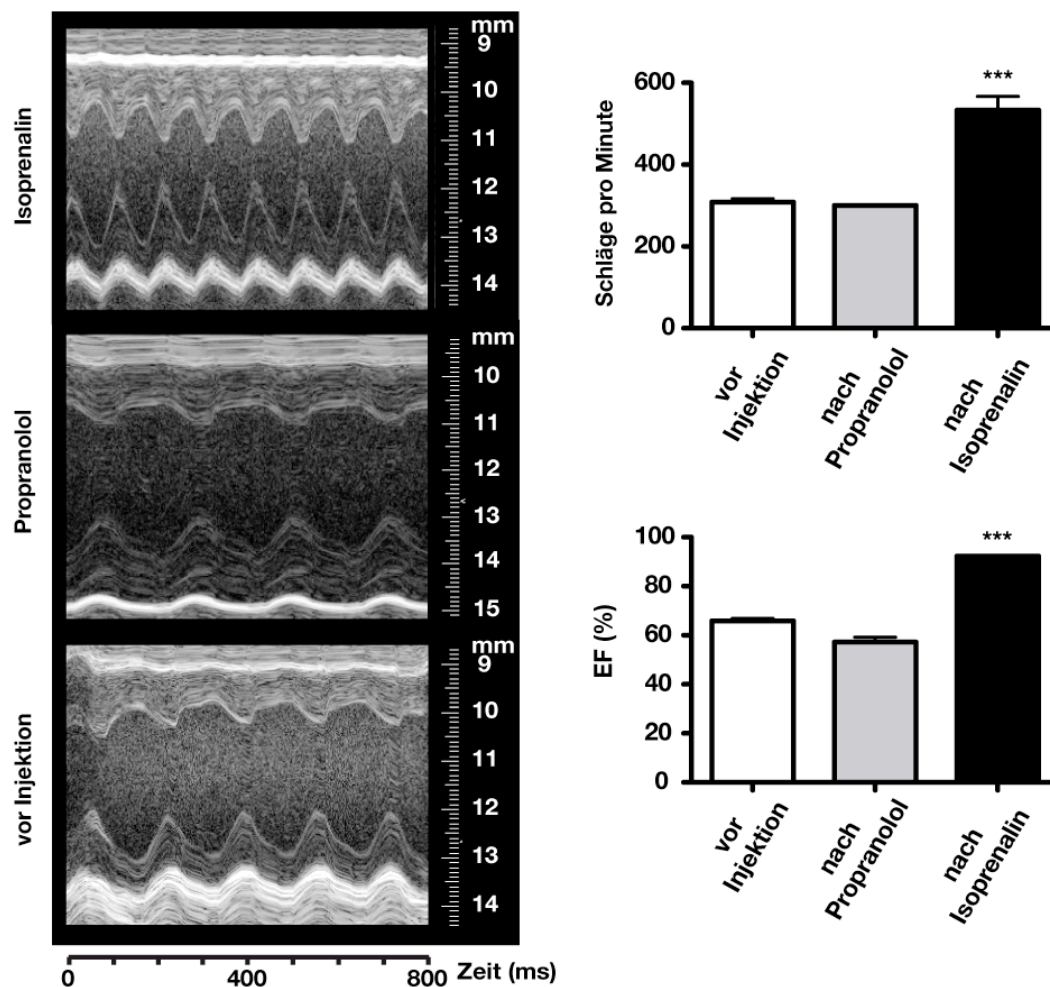


Abbildung 16: B-Mode (*brightness modulation*)-Echokardiographie der LV-Funktion von Mäusen (n vor Injektion =6, n nach Propranolol/Isoprenalin =3) vor und nach Isoprenalin- oder Propranolol-Injektion. Die Applikation von Isoprenalin bewirkte einen deutlichen Anstieg der Auswurffraktion (EF) und der Herzfrequenz (Schläge pro Minute), beides Parameter der LV-Kontraktilität.

3.1.2 Proteolytischer Verdau

Zur massenspektrometrischen Analyse phosphorylierter Proteinen wurde der „*bottom up*“-Ansatz gewählt. Dieser erfordert den proteolytischen Verdau der biologischen Proben, wofür Trypsin als Protease gewählt wurde. Ein Problem für den proteolytischen Verdau stellte die hohe Detergenzkonzentration des Lysepuffer dar. Durch eine 20/1 Verdünnung der Lysate mit Verdauopuffer konnte allerdings ein effizienter Verdau erreicht werden, da eine SDS-Konzentration von 0,1% im Toleranzbereich des verwendeten Enzym liegt.

Abbildung 17 zeigt eine repräsentative Silberfärbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteinlysate vor und nach tryptischem Verdau. Während in den unverdauten Proteinspuren je-

weils die intakten Proteine zu erkennen sind, enthalten die verdauten Lysate lediglich die tryptischen Peptide in der Gel-Lauffront.

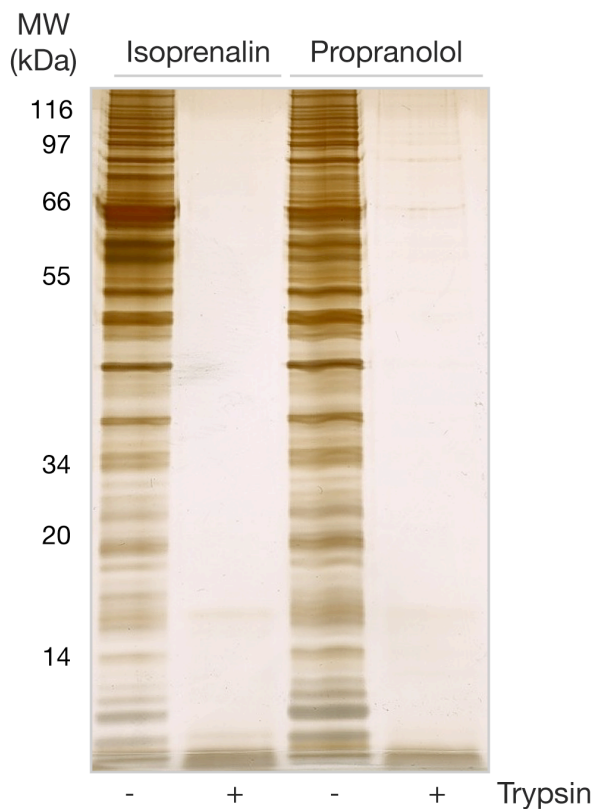


Abbildung 17: Kontrolle des Trypsinverdaus. Herzlysate mit Propranolol- oder Isoprenalin-behandelter Mäuse vor und nach enzymatischem Verdau. Die über eine 1D-SDS-Page aufgetrennten Proteine/Peptide wurden im Anschluss durch eine Silberfärbung visualisiert. Die prominente Bande in der Gel-Lauffront der trypsinisierten Lysate ist auf verdaute Peptide zurückzuführen.

3.1.3 Nano-LC-MS/MS Phosphopeptid-Analyse nach IMAC- und TiO_2 -Anreicherung

Die Analyse der Phosphopeptide nach IMAC- und TiO_2 -Anreicherung erfolgte mittels nano-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (nano-LC-MS/MS). In die Auswertung wurden nur Spektren \geq des Mascot Schwellenwertes ($P < 0,05$) einbezogen. Zur Erhöhung der Datenqualität wurden alle Spektren manuell validiert. Peptide einer Länge von < 5 oder > 30 Aminosäuren wurden verworfen, zudem wurde auf eine ausreichende Abdeckung der y- und b-Ionenserie (möglichst $> 50\%$) mit einem guten Signal/Rausch-Verhältnis geachtet. Die Zuordnung prominenter, nicht annotierter Peaks (interne Fragmente, Neutralverluste von H_2O , NH_3 , H_3PO_4) erfolgte mit Hilfe des Programms ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>, Tool: MS-Pattern).

In zwei Versuchsdurchgängen konnten nach IMAC und TiO_2 -Anreicherung insgesamt 430 Phosphopeptide detektiert werden. Mehrere dieser Phosphopeptide konnten bekannten kardialen Phosphoproteine zugeordnet werden. Zusätzlich konnten zahlreiche Proteine als neue kardiale Phosphoproteine identifiziert werden (10.4).

Nach IMAC-Anreicherung wurden insgesamt 272 Phosphopeptide detektiert, wovon 81 Peptide (18,8%) ausschließlich durch das IMAC-Verfahren angereichert werden konnten. 350 phosphorylierte Peptide konnten nach TiO_2 -Anreicherung identifiziert werden, 158 (36,7%) davon spezifisch nach TiO_2 -Isolation. 191 (44,3%) Phosphopeptide konnten mit beiden Verfahren nachgewiesen werden. Abbildung 18 zeigt, dass beide Anreicherungsverfahren jeweils nur ein Teilsegment des Phosphoproteoms isolieren. In dieser Arbeit wurde, die Anzahl der Phosphopeptide betreffend, mit der TiO_2 -Anreicherung ein deutlich besseres Ergebnis erzielt.

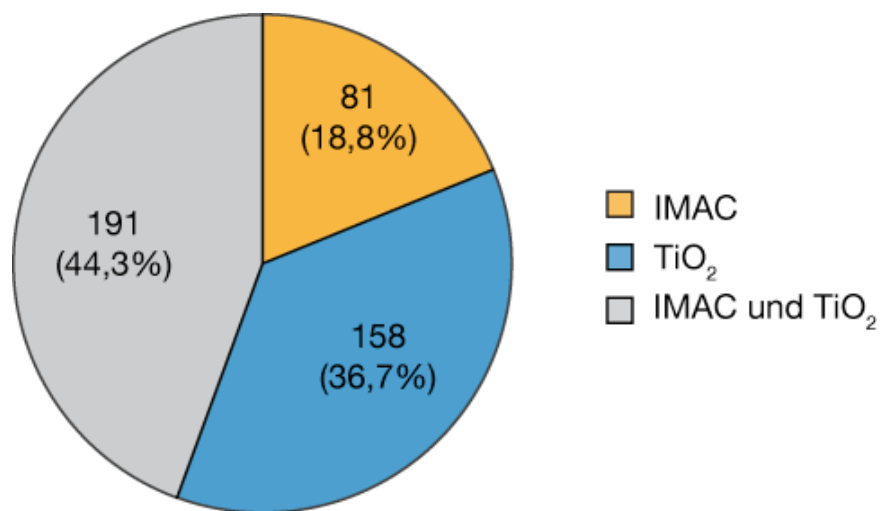


Abbildung 18: Die IMAC und TiO_2 -Anreicherung erlaubten die Identifikation von insgesamt 430 Phosphopeptide, detektiert in zwei Analysen. 191 (44,3%) der Phosphopeptide konnten mittels beider Verfahren angereichert werden, 81 (18,8%) spezifisch durch IMAC, 158 (36,7%) ausschließlich durch TiO_2 -Anreicherung.

Unterscheidet man die 430 identifizierten Phosphopeptide nach der Art des modifizierten Aminosäurerestes, konnten 88,6% (413) mit einer Phosphatgruppe am Serin detektiert werden. 5,4% (25) Phosphorylierungsstellen wurden an Threoninen identifiziert, lediglich 0,2% (1) phosphorylierte Tyrosine konnten nachgewiesen werden. 27 (5,8%) Phosphorylierungsstellen konnten nicht eindeutig Serin oder Threonin zugeordnet werden (Abb. 19).

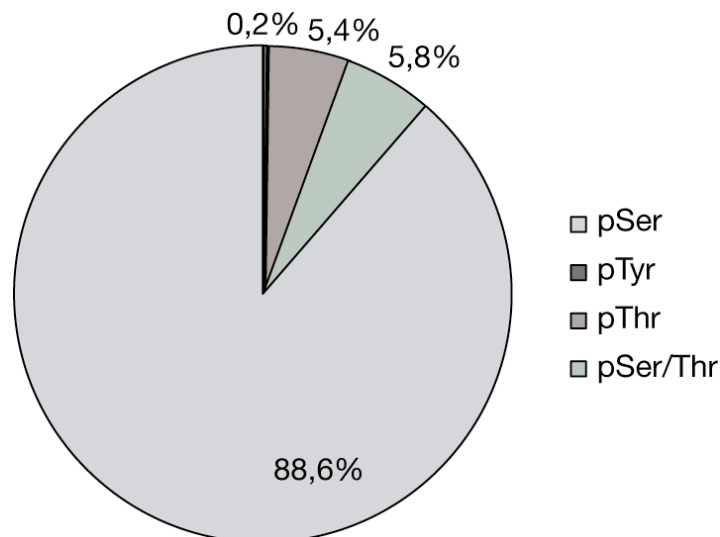


Abbildung 19: Aufteilung der Phosphorylierungsstellen nach Art der modifizierten Aminosäuren. 88,6% (413) der phosphorylierten Aminosäuren waren Serine, 5,4% (25) Threonine und 0,2% (1) Tyrosine. 5,8% (27) Phosphorylierungen konnten nicht eindeutig Serin oder Threonin zugeordnet werden.

Die identifizierten Phosphopeptide sind über zahlreiche Kompartimente verteilt. Die Swiss-Prot Proteindatenbank gibt für den größten Teil (31%) der phosphorylierten Peptide eine zytosolische Lokalisation an, 18% sind membranassoziiert, 17% nukleär, 15% lokalisiert am Zytoskelett, 6% sind an den Zell-Zell Adhäsionen beteiligt bzw. angesiedelt. Die restlichen 8% sind über weitere unterschiedliche Kompartimente verteilt (Abb. 20).

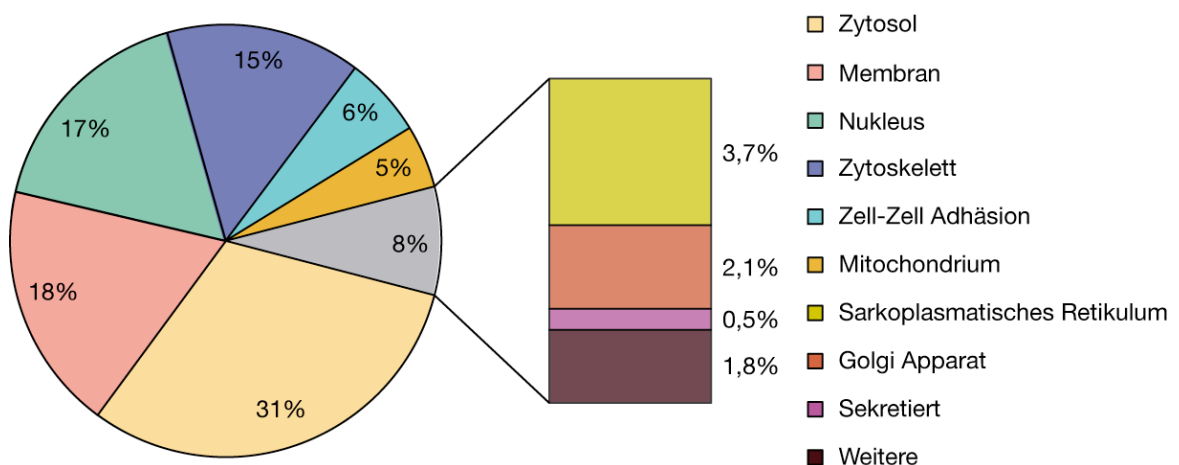


Abbildung 20: Lokalisationsinformation der identifizierten Phosphopeptide gemäß der Swiss-Prot Datenbank. Der größte Teil der detektierten Proteine ist neben dem Zytosol an der Membran, im Nukleus oder am Zytoskelett angesiedelt. Proteine ohne Lokalisationsangabe in der Swiss-Prot Datenbank wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt.

3.1.4 Das kardiale β -adrenerge Phosphoproteom

Aus den insgesamt 430 identifizierten Phosphopeptiden wurden 88 Phosphopeptide spezifisch in β -adrenerg stimuliertem Gewebe nachgewiesen (Tabelle 3.1.4.1). 51 dieser 88 Phosphorylierungsstellen sind bereits in der Swiss-Prot Datenbank annotiert, zwei dieser 51 Positionen werden als PKA-Phosphorylierungsstelle in der Datenbank erwähnt (P60840, Alpha-endosulfine, S108 oder S109; P56212, cAMP-regulated phosphoprotein 19, S104)^{85,86}. Weitere neun Phosphorylierungsstellen sind als „*by similarity*“ aufgelistet. Diese neun Positionen wurden für andere Familienmitglieder der jeweiligen Proteine experimentell identifiziert und konnten im Zuge dieser Arbeit in murinem kardialen Gewebe bestätigt werden. 28 potentiell β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstellen sind noch nicht in Swiss-Prot annotiert.

Untersucht man die 88 β -adrenerg spezifischen Phosphopeptide auf PKA-Konsensussequenzen ($R/K-R/K-x_1-S/T-x_{+2}$; $R-x_2-x_1-S/T-x_{+2}$; $R-x_1-S/T-x_{+2}$; $x_{+2} \neq P$) enthalten 39 der 88 phosphorylierten Peptide eine potentielle PKA-Konsensussequenz (Abb. 21). Für die restlichen 49 Phosphorylierungsstellen kann eine direkte PKA-Phosphorylierung nicht ausgeschlossen werden, allerdings ist eine Regulation durch eine andere, an der β -adrenergen Signaltransduktion beteiligten Kinase wahrscheinlicher.

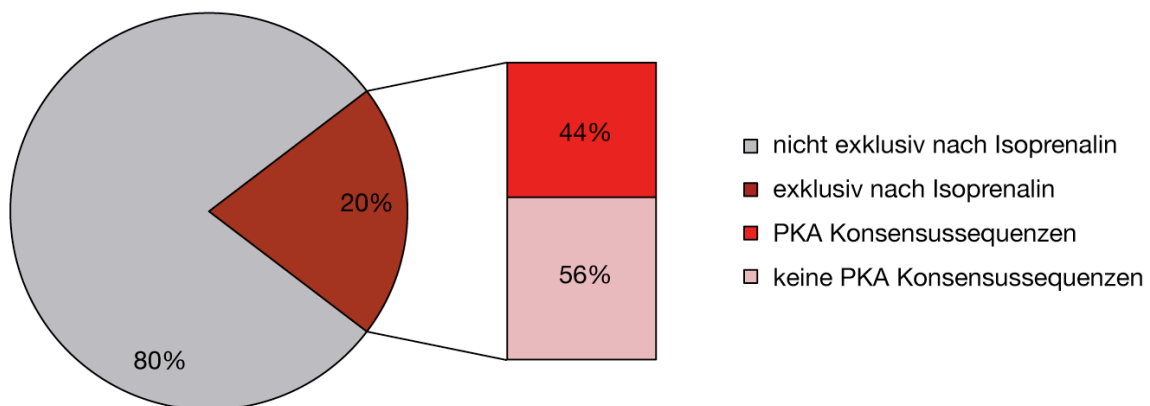


Abbildung 21: Anteil (20%, 88) der phosphorylierten Peptide, die ausschließlich nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin identifiziert wurden. 44% (39) der 88 unter Isoprenalin-Stimulation detektierten Phosphopeptide enthalten eine potentielle PKA-Konsensussequenz.

Tabelle 3.1.4.1 enthält alle ausschließlich unter Isoprenalin-Stimulation detektierten Phosphopeptide der graphischen Darstellung aus Abbildung 21. Swiss-Prot Accession, Name und die jeweilige Sequenz des detektierten Phosphopeptids sind angegeben. Zusätzlich wurden Phosphorylierungsstellen potentieller PKA-Konsensussequenzen rot markiert.

Tabelle 3.1.4.1: Auflistung der 88 exklusiv nach β -adrenerger Rezeptorstimulation identifizierte Phosphopeptide. Die Swiss-Prot Accession, der Proteinname und die Peptidsequenz sind angegeben. Eine rote Markierung kennzeichnet potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen. Mit # sind die Peptide kenntlich gemacht, die sowohl über das TiO_2 - als auch über das IMAC-Verfahren isoliert wurden. In Klammern sind nicht eindeutig definierte Phosphorylierungsstellen enthalten.

Accession, Proteinname	Sequenz
A2ASS6, Titin	QQpSPSPIR
O08547, Vesicle-trafficking protein SEC22b	NLGpSINTELQDVQR
O55111, Desmoglein-2	GpSVGCCSFIEGELDDLFLDDLGLK
P07310, Creatine kinase M-type	GpTGGVDTAAVGAVFDISNADR
P08553, Neurofilament medium polypeptide	pSPVEEVKPKPEAK
P10711, Transcription elongation factor	KKEPAISSQNpSPEAR
P16546, Spectrin alpha chain, brain	pSLQQLAEER
P20357, Microtubule-associated protein 2	VDHGAEIITQpSPSR
P26231, Catenin alpha-1	TPEELDDpSDFETEDFDVR
P48787, Troponin I	#AKEpSLDLR#
P49586, Choline-phosphate cytidyltransferase A	TpSPpSSSPASLSR
P52479, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	TCDpSPQNPVDFISGPVPDSPFPR
P54071, Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	DQpTNDQVTIDSALATQK
P56212, cAMP-regulated phosphoprotein 19	#KPpSLVASK#
P56695, Wolframin	LNATApSLEQDKIEPPR
P57776, Elongation factor 1-delta	ATAPQTQHVpSPMR
P59017, Bcl-2-like 13 protein	TpSPTPSVFVELGEEEELEAVTARPEA- VER
P60840, Alpha-endosulfine	KSpSLVTSK
P70268, Serine/threonine-protein kinase N1	TDVSNFDEEFTGEAPTLpSPPR
P70452, Syntaxin-4	QGDNIpSDEDEVR
Q02248, Catenin beta-1	RTSMGGTQQQFVEGVR (T2/S3)
Q02357, Ankyrin-1	IPCVpTPETVVIR
Q02566, Myosin-6	KMESDLTQLQTEVEEAVQECR, (S4/T7)
Q04735, Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1 OS	NLQEEIpSDLTEQLGEGGK
Q3TCH7, Cullin-4A	KISTEDINKR (S3/T4)
Q52KI8, Serine/arginine repetitive matrix protein 1	KGpSVSALMGR
Q569Z6, Thyroid hormone receptor-associated protein 3	REpSPSPAPKPR
Q61234, Alpha-1-syntrophin	NKKpSPEIHR
Q61235, Beta-2-syntrophin	NSAGGTSVGWDpSPPASPLQR
Q61703, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	GLGPPpSPPAPPR
Q62077, 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	pTILDDL
Q62261, Spectrin beta chain, brain 1	EGpSFEAR
Q62407, Striated muscle-specific serine/threonine protein kinase	GDQVSQNGLPAEQGpSPR
Q62417, Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	AApSSEAAPHHQPPESR SDpSPPAPLRPWVPLR #YpSFSDDTK# #GTPSSSPVpSPQESPK#, REpSDGTPGGLASLENER
Q64012, RNA-binding protein Raly	LPAPQEDTASEAGpTPQGEVQTR
Q63918, Serum deprivation-response protein	DEEALEDpSAEEK
Q65CL1, Catenin alpha-3	pSHTSIQTEGK

Q6IR34, G protein signaling modulator 1	#ApSVGSLPGLR#
Q6P4S6, Serine/threonine-protein kinase	RApSDGGANIQLHAQQLLK
Q6P542, ATP-binding cassette sub-family F member 1	QLpSVPASDEEDEVPAPIPR
Q70KF4, Cardiomyopathy-associated protein 5	GpSFSSTPELGHTSLLLK
Q7TMY8, E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	GSGTApSDDEFENLR
Q7TQD2, Tubulin polymerization-promoting protein	RLSLESEGANEGATAAPELSA- LEEAFR, (S3/S6)
Q8BG95, Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	RLpSSLFNK
Q8BGC0, HIV Tat-specific factor 1 homolog	VLDEEGpSER
Q8BL97, Splicing factor, arginine/serine-rich 7	#SGSIIGSR# (S1/S3)
Q8BTI8, Serine/arginine repetitive matrix protein 2	RSpSSELSPEVVEK
Q8BVZ1, Lipid storage droplet protein 5	SMpSQAMDMVLGK
Q8BWB1, Synaptopodin 2-like protein	pTPPPMAPK
	RFSTPAPQPTAEPLAPTVLVPR, (S3/T4)
Q8C079, Protein FAM40A	AASPPASASDLIEQQQK, (S3/S7/S9)
Q8C0R0, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37	pSGLLENRTEK
Q8CC35, Synaptopodin	#VASLpSPAR#
Q8CI12, Smoothelin-like protein 2	SPpSVEHDEASDLEVR
Q8CI51, PDZ and LIM domain protein 5	RGpSQGDIK
Q8K1Z0, Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	
Q8K2F8, LSM14 protein homolog A	YTDQpSGEEEEEDYESEEQLQHR
	SSPQLDPLRK (S1/S2)
Q8K2Z4, Condensin complex subunit 1	pSPTMEQAVQTASAHLPAAPVGR
Q8K3H0, DCC-interacting protein 13-alpha	RTpTPIR
Q8K4G5, Actin-binding LIM protein 1	VNQSALEAVTPpSPSFQQR
	STSQGpSINSPVYSR
	STpSQGpSINSPVYSR
Q8K4I3, Rho guanine nucleotide exchange factor 6	TLpSPTPpSAEGYQDVR
Q8N7N5, WD repeat-containing protein 42A	#KApSEEEYVIR#
Q91W69, Epsin-3	#GHGHpSDEEDEEQPR#
	TPVLPSGPPIADPWAPSSPTR (S17/S18)
Q99MR9, Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A	RGSGSSEDMYLDTPTSASR (S3/S5/S6)
Q99P72, Reticulon-4	RGSGSVDETLFALPAASEP- VIPSSAEK (S3/S5)
Q9CY58, Plasminogen activator inhibitor 1	SKSEEHAEDSVMDHHFR (S1/S3)
Q9CZJ2, Heat shock 70 kDa protein 12B	SPVPpSPPGpSPR
Q9D0F9, Phosphoglucosyltransferase-1	AIGGIILTApSHNPGGPNGDFGIK
Q9D0V7, Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells	
Q9DC77, Small muscular protein	KLpSGDQITLPTTVDYSSVPK
	#RKESTPETEEGAPTTSEEK# (S3/T4)
Q9DCF9, Translocon-associated protein subunit gamma	KLpSEADNR
Q9DCT8, Cysteine-rich protein 2	KTpSGPPKGPSK
Q9EQW7, Kinesin-like protein KIF13A	RApSNQELTEVGR
Q9ET54, Palladin	IApSDEEIQGTK
Q9ET78, Junctophilin-2	TpSLGSQR
	RSDpSAPPSPVSATVPEEEPPAPR
Q9JJW5, Myozenin-2	#KVpSIPR#
Q9JLV1, BAG family molecular chaperone regulator 3	#SSLGSHQLPR# (S1/S2)
Q9QXS1, Plectin-1	RApSFAEK
Q9R0L6, Pericentriolar material 1 protein	VTNAIpSPESSPGVGR
Q9Z1E4, Glycogen [starch] synthase, muscle	HSSPHQSEDEEEPR (S2/S3)

3.1.4.1 Myozenin-2 und G protein signaling modulator 1 als neue β -adrenerg regulierte Phosphoproteine

Zwei bisher unbekannte potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen aus Tabelle 3.1.4.1 konnten in den Proteinen Myozenin-2 (MYOZ2, Serin 37) und G protein signaling modulator 1 (GPSM1, Serin 567) identifiziert werden. Das Phosphopeptid KVpSIPR des MYOZ2 wurde außerdem in einer LC-MS/MS-Messung humanen Herzwes aus Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachgewiesen. Während für MYOZ2 weitere, sehr wahrscheinlich nicht β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstellen (T107, S111, T116) detektiert wurden, war Serin 567 die einzige in dieser Arbeit identifizierte phosphorylierte Aminosäure in GPSM1. Serin 37 des MYOZ2 und Serin 567 des GPSM1 wurden für eine weitere funktionelle Analyse im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt (3.2-3.3).

Das MS/MS-Spektrum des murinen und menschlichen Phosphopeptids KVpSIPR des MYOZ2 enthält die gesamte mögliche y -Ionenserie ($y1-5$), die ab $y(4)$ einen Neutralverlust von -98 Da aufweist. Dies deutet auf eine Phosphorylierung des dritten Serins hin. Die nicht annotierten intensiven Signale ($x1$), ($x2$) können dem Mutterion M nach Neutralverlust $x1 = [MH-H_3PO_4-H_2O]^{2+}$ und $x2 = [MH-H_3PO_4]^{2+}$ zugewiesen werden (Abb. 22). Bei der Phosphorylierungsstelle handelt es sich um eine PKA-Konsensussequenz (KKVS).

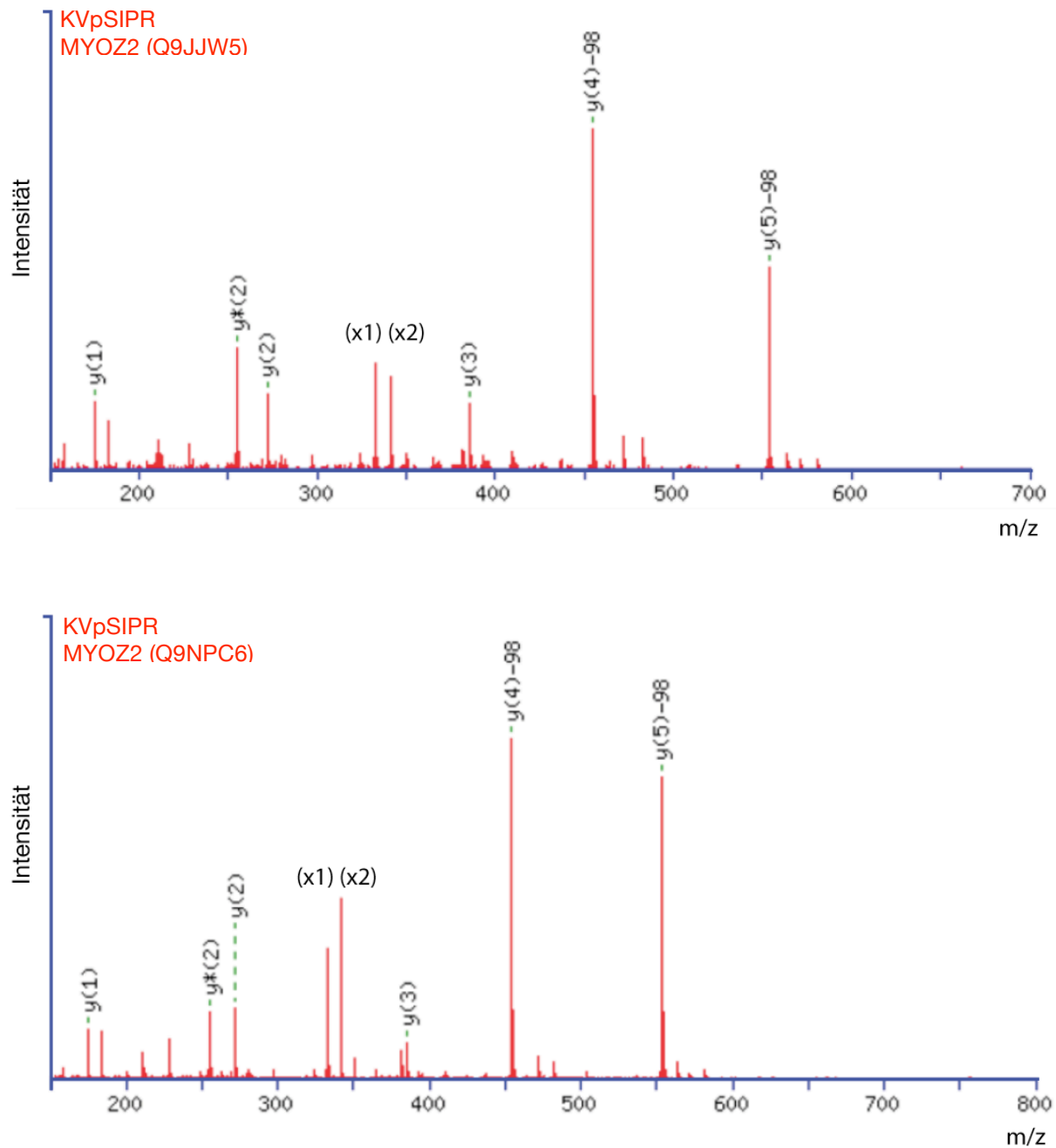


Abbildung 22: MS/MS-Spektren des murinen (Spektrum oben) und menschlichen (Spektrum unten) Phosphopeptids KVpSIPR. Im Mausherzen wurde dieses Phosphopeptid ausschließlich nach β -adrenerger Stimulation nachgewiesen.

MS/MS-Spektrums ApSVGDLPLGLR des murinen GPSM1 Proteins zeigt neben einer y-Ionenserie (y1-9; y(2) nicht detektiert) ein intensiver Prolin-Peak y(4), ein charakteristisches Kennzeichen eines MS/MS-Spektrums. Die annotierten Neutralverluste von b(3) und y(9) von -98 Da lassen auf eine Phosphorylierung des Serins an Position drei schließen. Der nicht

zugeordnete Peak bei $m/z = \sim 217$ ist vermutlich $y(4)\text{-NH}_3^{2+}$ oder $y(4)^{2+}$ zuzuschreiben (Abb. 23). Die Position 567 des GPSM1 ist eine PKA-Konsensussequenz (RASV).

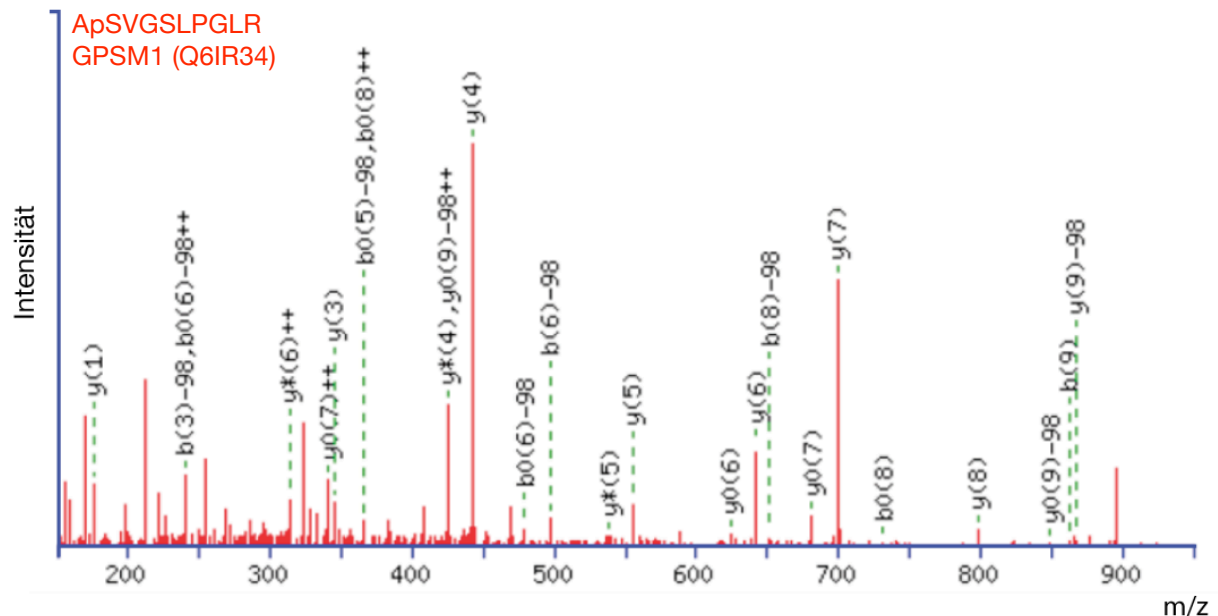


Abbildung 23: MS/MS-Spektrum des Phosphopeptids ApSVGSLPGLR, gefunden ausschließlich unter β -adrenerger Stimulation im murinen GPSM1 (Q6IR34)

3.1.5 Relative Quantifizierung mittels MRM

Um eine differenzielle Regulation der 88 ausschließlich unter β -adrenerger Stimulation detektierten Phosphorylierungsstellen weiter zu untersuchen, wurde eine Quantifizierung mittels *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) durchgeführt. Es wurden sieben Phosphopeptide aus sieben unterschiedlichen Proteinen ausgewählt, die in der LC-MS/MS-Messung eine Phosphorylierung exklusiv nach Isoprenalin-Stimulation zeigten (Tabelle 3.1.5.1). Außerdem wurde Threonin 107 des MYOZ2, welches neben Isoprenalin-stimuliertem Gewebe auch in Propranolol-behandelten Herzen detektiert wurde, relativ quantifiziert. Die bis dahin unbekannte Phosphorylierungsstelle Threonin 107 wurde mittlerweile als Position 107 des MYOZ2 bestätigt⁸⁷. Dieses Phosphopeptid diente in den MRM-Messungen als interner Kontrolle.

Tabelle 3.1.5.1: Darstellung der acht Phosphopeptide aus sieben verschiedenen Proteinen, die für die MRM-Quantifizierung ausgewählt wurden. In rot sind potentielle PKA Konsensussequenzen markiert.

Q9DC77, Small muscular protein	S36 /T37, (RRKE S TP)
Q8BG95, Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	S420 (RRLp S S)
Q9JJW5, Myozenin-2	S37 (KKV p SI)
	T107 (GP S pTP)
Q9ET78, Junctophilin-2	S593 (RSD p SA)
Q8CC35, Synaptopodin	S765 (ASL S P)
P59017, Bcl-2-like 13 protein	S343 (EKT S P)
Q6IR34, G protein signaling modulator 1	S567 (QRA p SV)

Während es sich bei fünf der sieben potentiell differenziell regulierten Phosphopeptide um bislang unbekannte Phosphorylierungsstellen handelte, ist Serin 343 des Bcl-2-like 13 protein bereits in der Swiss-Prot Datenbank annotiert, allerdings ohne Angabe einer möglichen Kinase⁸⁸. Serin 593 des Junctophilin-2 konnte zusammen mit Serin 600 des Junctophilin-2 als zweifach phosphoryliertes Peptid sowohl unter Rezeptorstimulation als auch Inhibition detektiert werden. Das S593-Monophosphopeptid konnte nur unter Isoprenalin-Stimulation nachgewiesen werden. Durch MRM-Messung wurde das S593-Monophosphopeptid bezüglich einer β -adrenerge Regulation untersucht.

Für jedes Peptid wurden vier MRM-Übergänge gewählt, was den Ausschluss falsch positiver Signale, die gerade in komplexen Proben für einzelne Übergänge auftreten, gewährleistet (Tabelle 10.2.1). In die Auswertung wurden nur Peptide aufgenommen, für die mindestens drei der vier Übergänge beobachtet werden konnten und deren Signal spezifisch vom Hintergrundrauschen unterscheidbar war. Um Verluste bei der Probenaufarbeitung zu kontrollieren, wurden jeder Probe vor Phosphopeptidanreicherung jeweils zwei der drei synthetischen Phosphopeptidstandards aus Tabelle 10.1.1 zugesetzt. Diese wurden ebenfalls relativ quantifiziert und zur Normalisierung verwendet.

Abbildung 24 zeigt die graphische Darstellung der MRM-Messungen. Zur Ermittlung der jeweiligen Verhältnisse wurden die Propranolol-behandelten Proben als Kontrolle definiert. Das als interner Kontrolle gewählte Phosphopeptid des MYOZ2 war wie erwartet nicht reguliert, die relative Quantifizierung ergab in Messung 1 und 3 einen Faktor < 1 (Messung 1: 0,83; Messung 3: 0,91). Dies spricht für eine tendenziell zu niedrig bewertete Phosphorylierung der Isoprenalin-behandelten Gruppen. In Messung 2 scheint der Phosphorylierungsgrad der Isoprenalin-Gruppe um den Faktor 2,3 zu hoch bewertet zu sein. Für die Normalisierung der relativen Verhältnisse wurden nur die synthetischen Standardpeptide verwendet, allerdings ist generell eine Kombination aus externem Standard zusammen mit internen, nicht-regulierten Phosphopeptiden als zusätzliche Kontrolle zu empfehlen.

Die relative Quantifizierung bestätigte die neu identifizierten Phosphorylierungsstellen in den Proteinen Small muscular protein (Q9DC77), Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B (Q8BG95), Myozenin-2 (Q9JJW5, Serin 37) und G protein signaling modulator 1 (Q6IR34) als differenziell reguliert. Eine Tendenz zu erhöhter Phosphorylierung unter β -adrenerger Stimulation zeigten die Phosphopeptide aus dem Juncophilin-2 und Bcl-2-like 13 protein, die Phosphorylierungsstelle Serin 765 des Synaptopodin war nicht reguliert. Die gewählten Übergänge für Small muscular protein, Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B und Juncophilin-2 konnten nur in zwei der drei Messungen detektiert werden, die des Bcl-2-like 13 protein nur in einer Messung der drei Messungen.

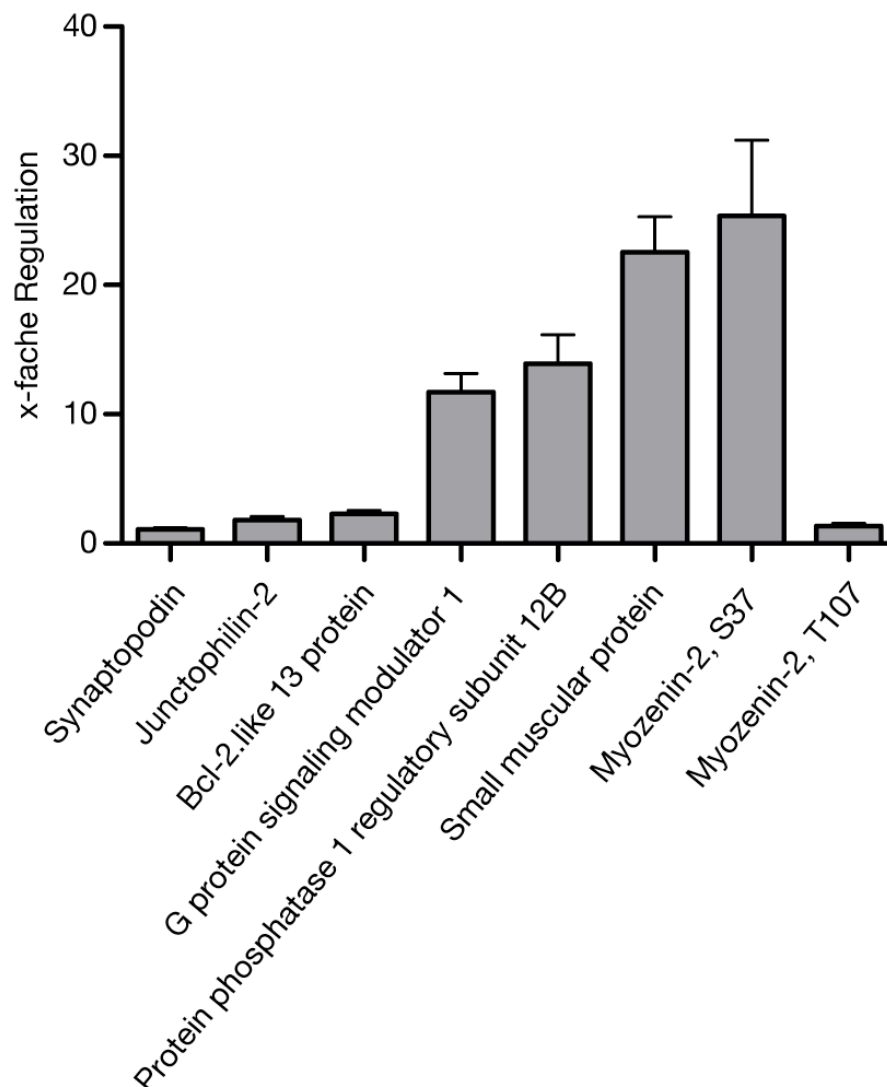


Abbildung 24: Graphische Darstellung der relativen Quantifizierung der acht analysierten Phosphorylierungsstellen (n=3), ausgedrückt als x-fache Regulation der Isoprenalin-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Propranolol). Jedes Verhältnis wurde auf die in der Messung verwendeten Standards normalisiert.

3.2 Analyse der Phosphorylierungsstelle Serin 37 im MYOZ2

Die Phosphorylierungsstelle Serin 37 des Myozenin-2 (MYOZ2, Calsarcin 1) wurde in der LC-MS/MS-Analyse ausschließlich nach Isoprenalin-Stimulation detektiert und des Weiteren durch eine relative Quantifizierung mittels MRM als ~25-fach höher phosphoryliert bestätigt. MYOZ2 ist die herzmuskelspezifische Isoform einer Proteinfamilie, deren Mitglieder durch die Bindung an α -Aktinin an der sarkomerischen Z-Scheibe von Muskelzellen lokalisiert sind⁸⁹. Im Folgenden sollte eine Charakterisierung der Phosphorylierungsstelle Serin 37 des MYOZ2 vorgenommen werden.

3.2.1 Charakterisierung des phosphorylierungsspezifischen pS37-MYOZ2 Antikörpers

Für die Analyse der β -adrenerg regulierten Phosphorylierungsstelle Serin 37 im MYOZ2 wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefan Schulz und der Firma Gramsch Laboratories (Schwabhausen, D) ein phosphorylierungsspezifischer Antikörper entwickelt und getestet.

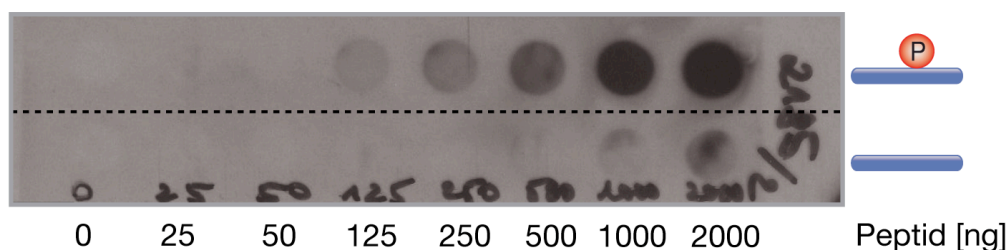


Abbildung 25: Dot-Blot des Serums Nummer 2185. Die obere Reihe zeigt eine Konzentrationsreihe des zur Immunisierung verwendeten phosphorylierten Peptids, untere Reihe die der nicht-phosphorylierten Peptidvariante. Der Dot-Blot wurde von Prof. Dr. Stefan Schulz und der Firma Gramsch Laboratories (Schwabhausen, D) durchgeführt.

In Abbildung 25 ist der Dot-Blot des Serums Nummer 2185 zu sehen, das als phosphorylierungsspezifischer Antikörper gegen das phosphorylierte Serin 37 (pS37) des MYOZ2 in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Antikörper erkennt im Dot-Blot nur das zur Immunisierung verwendete phosphorylierte Peptid im Gegensatz zum ebenfalls aufgetragenen unphosphorylierten Peptid.

Die Detektion der S37-Phosphorylierung mit dem pS37-MYOZ2-Antikörper zeigte in Mauseherzen, die zuvor mit Isoprenalin oder Propranolol behandelt worden waren, nur in dem Isoprenalin-stimulierten Herzen ein Signal, welches MYOZ2 entsprach (Abb. 26).

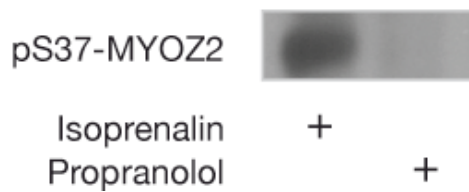


Abbildung 26: Western Blot von Herzlysaten β -adrenerg stimulierter oder inhibierter Mausherzen. Im Lysat des zuvor mit Isoprenalin stimulierten Mausherzens zeigt sich ein spezifisches Signal nach Detektion mit dem pS37-MYOZ2 Antikörper.

Um zu überprüfen, ob der pS37-MYOZ2-Antikörper spezifisch die S37-phosphorylierte Form des MYOZ2 erkennt, wurde eine Membran-Dephosphorylierung vorgenommen. Die identische Menge an Protein zweier Herzlysate, die zuvor mit Isoprenalin oder Propranolol behandelt worden waren, wurde als Duplikat auf eine Membran aufgebracht. Die Membran wurde nach Proteintransfer geteilt und eine der beiden Membranhälften vor pS37-Detektion mit Phosphatase behandelt. Die Phosphatase bewirkte einen deutlichen Rückgang der Signalintensität des pS37-MYOZ2-Antikörpers. Dies spricht für eine spezifische Detektion des phosphorylierten S37-MYOZ2 durch den Antikörper (Abb. 27).

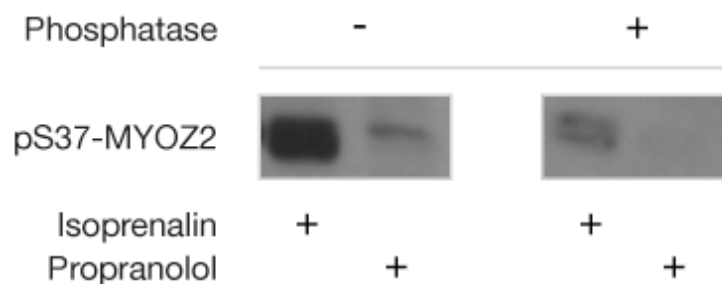


Abbildung 27: Western Blot-Membranen von Lysaten β -adrenerg stimulierter/inhibierter Mausherzen, die vor pS37-Detektion entweder mit oder ohne Phosphatase inkubiert wurden. Die phosphatasebehandelte Membranhälfte zeigt ein deutlich schwächeres Signal im Vergleich zur pufferbehandelten Membran.

3.2.2 Lokalisation von MYOZ2 und pS37-MYOZ2 im Zellkern

Die Immunofluoreszenz des endogenen MYOZ2 in NRCM wies eine deutliche Querstreifung der Kardiomyozyten auf (Abb. 28), welche bekannt ist und auf die α -Aktinin-vermittelte Lokalisation des MYOZ2 an der Z-Scheibe von Kardiomyozyten zurückgeführt wird⁸⁹. Neben der Z-Scheiben-Lokalisation konnte auch ein Signal im Zellkern detektiert werden.

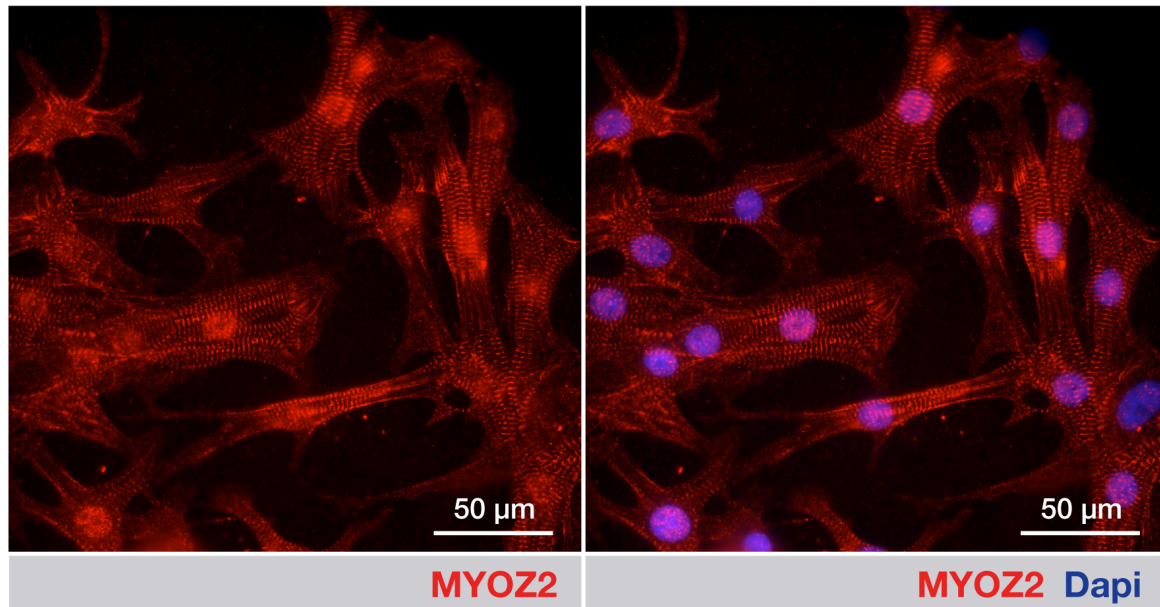


Abbildung 28: Antikörperfärbung PFA-fixierter neonataler Kardiomyozyten. Die Färbung des endogenen MYOZ2 (rot) zeigt eine deutliche Querstreifung innerhalb der Zellen. Neben der Querstreifung ist außerdem ein Signal im Zellkern zu erkennen welches in der überlagerten Abbildung (rechtes Bild) mit der Kernfärbung (blau) co-lokalisiert.

Die deutliche Kernlokalisierung von MYOZ2 in der Immunofluoreszenz wurde weiter durch subzelluläre Fraktionierung von NRCM untersucht. Dabei wurden die Zellen in eine zytosolische, eine Zellmembran und membranhaltige Organellen-, eine Kern- sowie eine Zytoskelett-Fraktion aufgetrennt und mittels SDS-Page analysiert. Neben einem deutlichen Signal in der Zytoskelett-Fraktion konnte auch ein starkes Signal in der Kernfraktion detektiert werden. Als Kontrolle wurde α -Aktinin, eine Hauptkomponente des Zytoskeletts und ein Bindungspartner des MYOZ2, verwendet (Abb. 29).

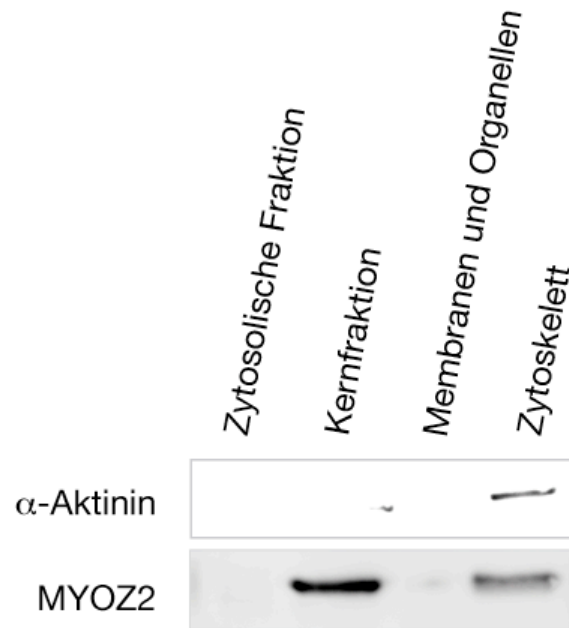


Abbildung 29: Western Blot-Analyse des endogenen MYOZ2 nach zellulärer Fraktionierung. Neben einer deutlichen Lokalisation des MYOZ2 in der Zytoskelett-Fraktion wurde auch ein starkes Signal in der Kernfraktion detektiert. Für alle Fraktionen wurde die gleiche Menge an Protein aufgetragen. Als Kontrolle wurde α -Aktinin, eine Hauptkomponente des Zytoskeletts, verwendet.

Um die Lokalisation der pS37-MYOZ2-Spezies in NRCM zu untersuchen, wurde eine Immunofluoreszenz von pS37-MYOZ2 nach Überexpression von MYOZ2 durchgeführt. Die pS37-MYOZ2-Färbung zeigte in Isoprenalin-stimulierten NRCM eine schwache Querstreifung, was der Lokalisation des pS37-MYOZ2 an der Z-Scheibe entsprach. Das dominierende Signal konnte im Zellkern beobachtet werden (Abb. 30). Die Propranolol-behandelten Zellen zeigten ein ähnliches, jedoch deutlich schwächeres Fluoreszenzmuster.

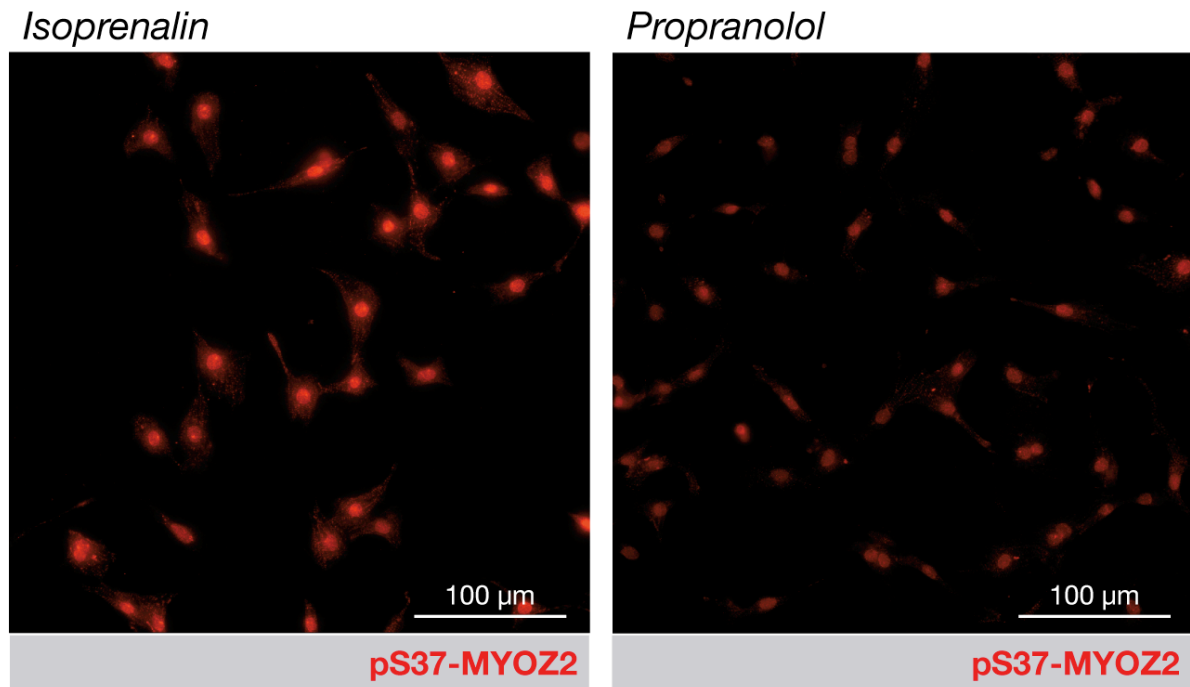


Abbildung 30: pS37-Immunofluoreszenz des überexprimierten MYOZ2 (AdMyoz2, ifu=50) in NRCM, die vor Fixierung 5 min mit 10 μ M (-)-Isoprenalin HCL oder 5 h mit 10 μ M (\pm)-Propranolol HCL behandelt wurden. Die Isoprenalin-stimulierten Zellen zeigen ein deutlich stärkeres Signal im Vergleich zu den Propranolol-behandelten Zellen.

3.2.3 Lokalisation der S37-Mutanten an der Z-Scheibe und im Zellkern neonataler Rattenkardiomyozyten (NRCM)

Zur weiteren Analyse der zellulären Lokalisation des MYOZ2 in Abhängigkeit von Serin 37 wurden phosphorylierungsspezifische Mutanten hergestellt. Dazu wurde Serin 37 zu Alanin (A) und Aspartat (D) mutiert. Die S37A-Mutation repräsentiert eine phosphorylierungsdefiziente Mutante, während die S37D-Mutation ein permanent phosphoryliertes Protein imitieren soll. Neben Serin 37 wurden zudem Threonin 107, Threonin 111 und Serin 116 als Phosphorylierungsstellen des MYOZ2 identifiziert. Um den Einfluss aller im MYOZ2 detektierten Phosphorylierungsstellen auf die zelluläre Lokalisation zu überprüfen, wurde zusätzlich eine vollkommen phosphorylierungsdefiziente Mutante kreiert. Da die mittlerweile bestätigte Position 107 zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig zugeordnet werden konnte⁸⁷, wurden Serin 106 und Threonin 107 mit Alanin ausgetauscht. Zur Unterscheidung der MYOZ2-Konstrukte vom endogenen MYOZ2 wurden alle Proteine C-terminal mit YFP fusioniert.

Für alle MYOZ2-YFP-Proteine konnte nach Expression in NRCM eine ausgeprägte Querstreifung der Zellen beobachtet werden. Eine Co-Immunofluoreszenz von MYOZ2-YFP und der S37-Mutanten mit endogenem α -Aktinin zeigte eine deutliche Signalüberlappung und bestätigte somit eine Co-Lokalisation der Proteine an der Z-Scheibe von NRCM (Abb. 31).

Die phosphorylierungsspezifischen Mutationen von Serin 37 verhinderten somit nicht die Interaktion von MYOZ2 mit α -Aktinin und die damit verbundene Lokalisation an der Z-Scheibe von NRCM.

Zusätzlich zu der Z-Scheiben-Lokalisation konnten alle Konstrukte im Zellkern von NRCM detektiert werden (Abb. 31). Dies steht im Einklang mit einer Färbung des endogenen MYOZ2, die nach Stimulation oder Inhibition β -adrenerger Rezeptoren ebenfalls keine Unterschiede der subzellulären Lokalisation des MYOZ2 zeigte (Abbildung nicht gezeigt). Die Mutation von Serin 37 zu Alanin oder Aspartat oder eine β -adrenerge Stimulation/Inhibition bestimmt somit nicht die Lokalisation von MYOZ2 innerhalb der Zelle.

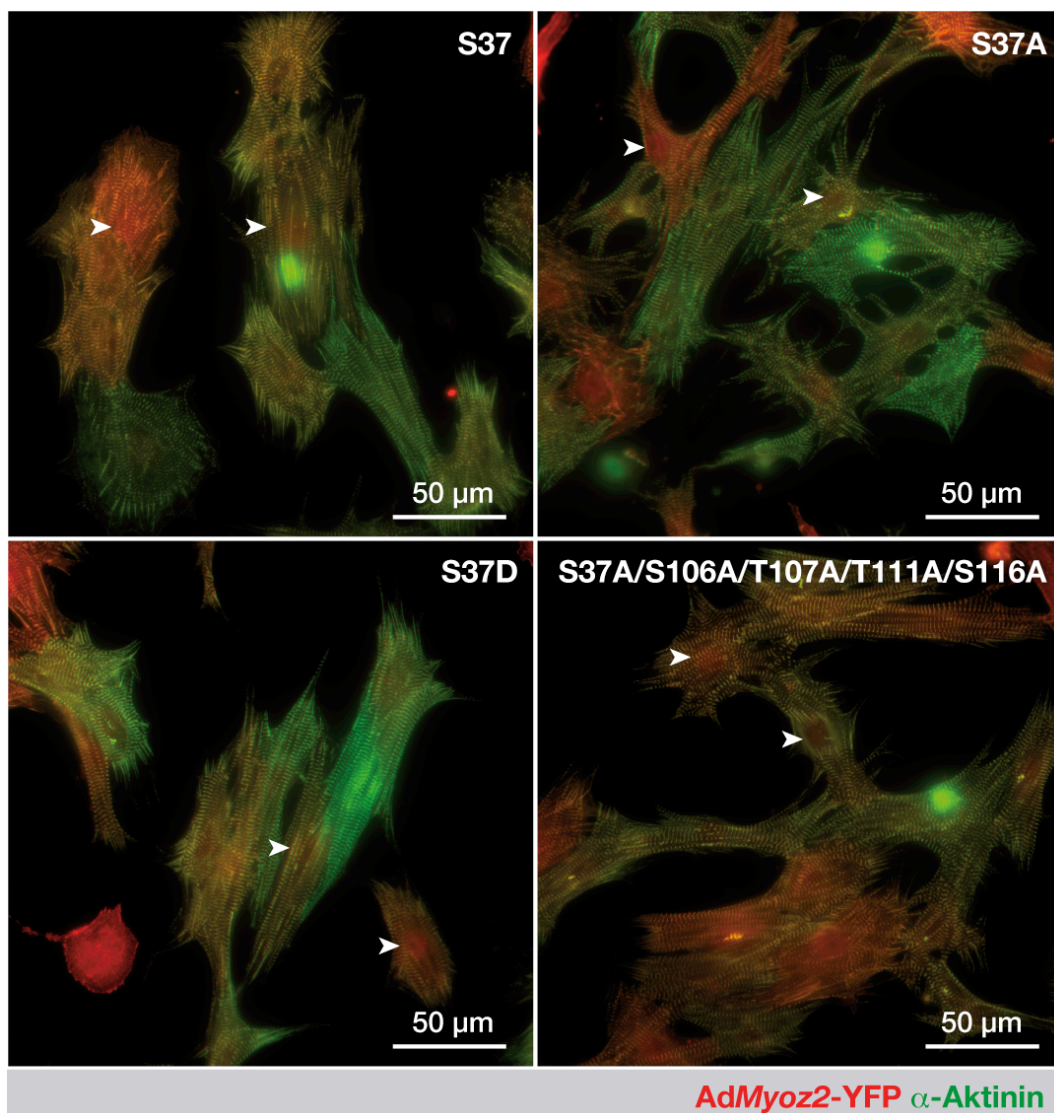


Abbildung 31: Co-Immunofluoreszenz von MYOZ2-YFP (rot) (AdMyoz2-YFP, ifu=20, anti-GFP-Färbung) mit dem endogenen α -Aktinin (grün) in NRCM. Die Pfeilspitzen markieren eine Kernlokalisierung der MYOZ2-YFP-Proteine. Die nukleäre Lokalisation konnte für alle untersuchten MYOZ2-Proteine beobachtet werden. Die gelbe Färbung zeigt die Co-Lokalisation von MYOZ2-YFP und α -Aktinin.

3.2.4 Einfluss der S37-Phosphorylierung auf die Interaktion mit den bekannten Bindungspartnern

Da die phosphorylierungsspezifischen Mutanten des Serin 37 keine offensichtlichen Unterschiede in der subzellulären Lokalisation sowie der Interaktion mit α -Aktinin erkennen ließen, wurde ein möglicher Einfluss der Phosphorylierung von Serin 37 auf die Interaktion des MYOZ2 mit weiteren bekannten Bindungspartnern untersucht. Neben α -Aktinin ist eine Bindung des MYOZ2 an Calcineurin, Telethonin (TCAP), LIM domain binding 3 (LDB3) und Filamin C (FLNC) beschrieben^{90,91}. Zur Analyse einer möglichen Serin 37-bedingten Modulation der Interaktion mit MYOZ2 wurden CoIP-Experimente durchgeführt. Während alle Proteine als Vollängenkonstrukte für die CoIP-Experimente eingesetzt wurden, wurden von FLNC nur die Aminosäuren 2133 bis 2726 verwendet, welche die bekannte Interaktionsdomäne des MYOZ2 enthielten⁹². FLNC und LDB3 wurden N-terminal mit einem V5-tag versehen. Für Calcineurin wurde die Isoform PPP3CB verwendet. Die Analyse der pS37-abhängigen Interaktion von MYOZ2 und der restlichen Bindungspartner wurde in einem zellfreien Expressionssystem durchgeführt. Nach *in vitro* Transkription und Translation wurden die rekombinanten Proteine in den anschließenden CoIP-Experimenten verwendet.

Alle Konstrukte wurden unter Einbau von radioaktivem [³⁵S] Methionin in einem zellfreien Kaninchen-Retikulozytenlysat translatiert. Die autoradiographische Detektion der Proteinbanden stimmte mit den erwarteten Größenverhältnissen überein, bis auf TCAP konnten alle Proteine mit guter Signalintensität detektiert werden. Da es sich bei TCAP um ein sehr kleines Protein handelt (19 kDa), besitzt es im Vergleich zu den anderen Proteinen nur sehr wenige Methionine (3), was eine autoradiographische Detektion nach [³⁵S] Methionin-Einbau erschwerte (Abb. 32).

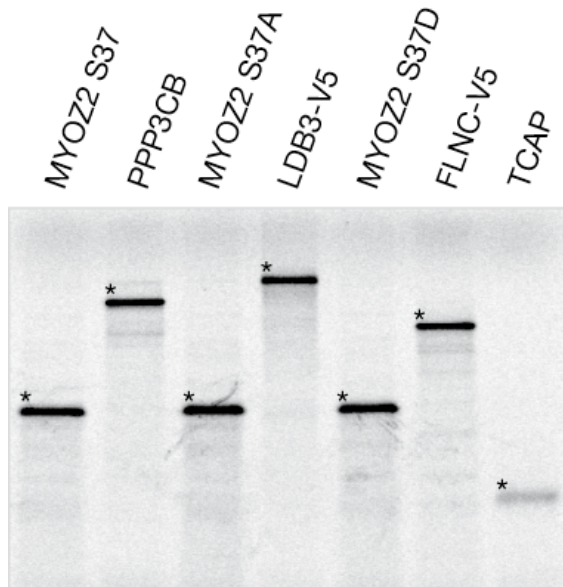


Abbildung 32: Repräsentativer Western-Blot der *in vitro* translatierten MYOZ2-Konstrukte und der bekannten MYOZ2-Bindungspartner nach autoradiographischer Detektion. * kennzeichnet jeweils die einzelnen Proteinbanden.

Um die Interaktion des MYOZ2 mit den einzelnen Bindungspartnern im zellfreien System zu testen, wurde eine CoIP des jeweiligen Bindungspartners mit MYOZ2 durchgeführt. Ein konstanter Anteil rekombinanten MYOZ2 Protein wurde mit einem der jeweiligen Bindungspartner inkubiert und co-immunopräzipitiert. Um sicher zu stellen, dass die Immunopräzipitation (IP) der einzelnen Bindungspartner erfolgte, wurde zusätzlich jeder Bindungspartner alleine immunopräzipitiert. Abbildung 33 zeigt die Autoradiographie nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-Gel. Als Ladekontrolle (L-Ctrl.) wurden jeweils 5% der zur IP eingesetzten Proteine aufgetragen. Für die IP der MYOZ2-Bindungspartner ist im Vergleich zur Ladekontrolle ein deutlich stärkeres Signal (*) zu erkennen, was auf eine erfolgreiche IP hindeutet. Das Signal des co-immunopräzipitierten MYOZ2 (*) war im Vergleich zur Ladekontrolle kaum sichtbar und nur im Fall der FLNC-V5-IP und LDB3-V5-IP etwas stärker als in der Kontrolle (Ctrl.) (Abb. 38).

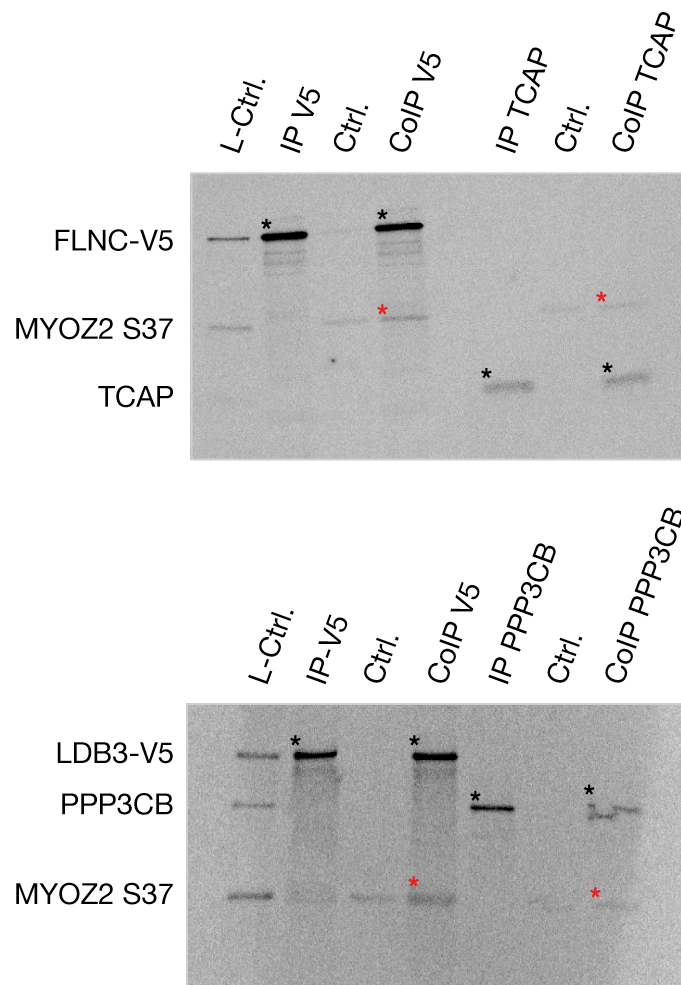


Abbildung 33: Autoradiographische Detektion der IP der einzelnen MYOZ2 Bindungspartner mit und ohne MYOZ2 nach SDS-PAGE. * kennzeichnet jeweils das immunopräzipitierte Konstrukt, während * die co-immunopräzipitierte MYOZ2-Bande kennzeichnet. Deutlich zu erkennen ist das im Vergleich zur Ladekontrolle (L-Ctrl.) wesentlich stärkere Signal der immunopräzipitierten Konstrukte. Das co-immunopräzipitierte MYOZ2 kann nur im Fall der FLNC-V5-IP und der LDB3-V5-IP etwas stärker als die Kontrolle (Ctrl.) detektiert werden.

Um durch die IP der MYOZ2-Konstrukte eine stärkere Detektion des jeweiligen Bindungspartners zu erreichen, wurden alle MYOZ2-Konstrukte mit einem C-terminalem HA-tag versehen und zusammen mit LDB3-V5 rekombinant exprimiert. Abbildung 34 zeigt die IP der MYOZ2-Konstrukte sowie die IP von LDB3-V5. In allen Fällen erfolgte eine deutliche IP der jeweiligen Konstrukte (*). Während durch die IP von LDB3-V5 alle MYOZ2-HA-Konstrukte mit stärkerer Intensität als in der Kontrolle nachgewiesen werden konnten, fand durch die HA-IP nur eine Bindung der S37A- und S37D-Mutante statt.

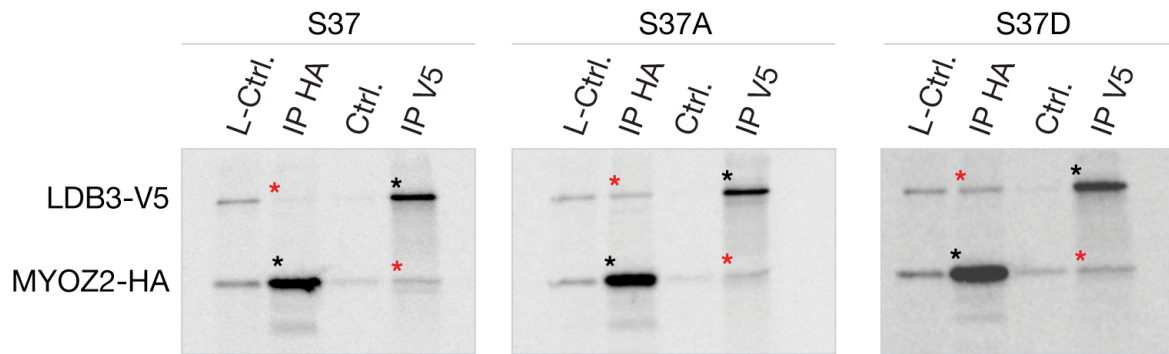


Abbildung 34: IP der einzelnen MYOZ2-HA-Konstrukte und LDB3-V5. * kennzeichnet die jeweilige IP-Bande, * markiert die CoIP des Bindungspartners. Die IP von LDB3-V5 zeigt ein Interaktion aller MYOZ2-HA-Konstrukte, die HA-IP weist nur im Fall der S37A- und S37D-Mutante im Vergleich zur Kontrolle ein stärkeres LDB3-V5-Signal auf.

Generell konnten durch beide IP-Verfahren nur sehr schwache Interaktionen von MYOZ2-HA und LDB3-V5 beobachtet werden, ohne Unterschiede zwischen der S37A- und S37D-Mutante. Durch die IP der MYOZ2-HA-Konstrukte konnte auch für die anderen Bindungspartner des MYOZ2 im Vergleich zu Abbildung 34 keine bessere Detektion der MYOZ2-Interaktion erreicht werden (Abbildung nicht gezeigt).

Aufgrund teilweise überlappender Bindedomänen der einzelnen Interaktionspartner wurde eine regulierte kompetitive Interaktion der Bindungspartner getestet. Die vier Interaktionspartner wurden zusammen mit MYOZ2 S37-HA, S37A-HA oder S37D-HA inkubiert und auf mögliche S37-bedingte Interaktionsunterschiede hin untersucht. Die nachfolgende IP der MYOZ2-Konstrukte wies trotz erfolgreicher IP nur eine äußerst schwache Interaktion aller Bindungspartner (Abb. 35) auf, was die Vermutung der kompetitiven Bindung der Interaktionspartner an MYOZ2 bestärkt. Eine vornehmliche Interaktion eines der Bindungspartner war nicht zu erkennen.

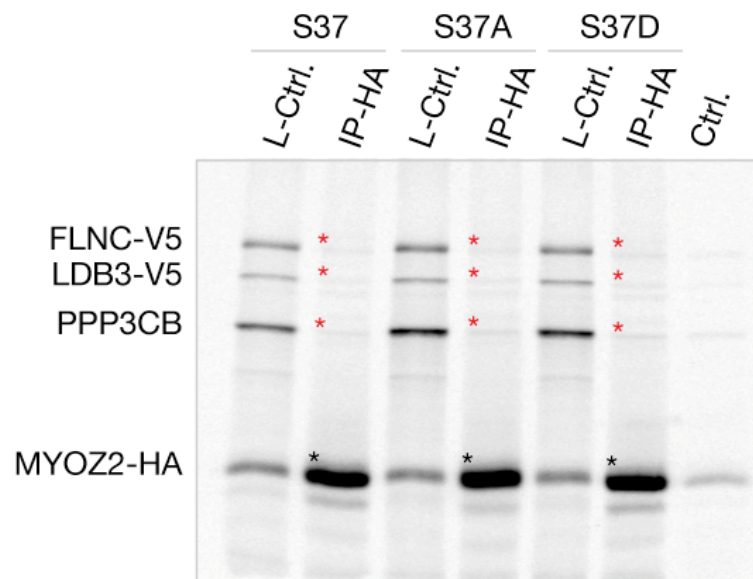


Abbildung 35: HA-IP nach Inkubation von rekombinantem MYOZ2-HA S37, S37A und S37D mit den vier rekombinanten Bindungspartnern. (*) kennzeichnet die jeweilige HA-IP-Bande, während (*) die Bande des co-immunopräzipitierten Bindungspartners markiert. Dem Bindungspartner TCAP konnte keine spezifische Bande zugeordnet werden.

Die CoIP-Versuche in einem zellfreien System erlauben aufgrund der kaum zu detektierenden Interaktion von MYOZ2 und den getesteten Bindungspartnern keine Aussage über die Abhängigkeit dieser Interaktionen von der Phosphorylierungsstelle Serin 37. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Interaktion des MYOZ2 mit seinen zahlreichen Bindungspartnern einer äußerst komplexen Regulation unterliegt, die in CoIP-Experimenten schwer zu erfassen ist.

3.2.5 Einfluss der Phosphorylierungsstelle Serin 37 des MYOZ2 auf die Calcineurin-Signaltransduktion in NRCM

Als Bindungspartner des Calcineurins ist MYOZ2 als negativer Regulator der Aktivität dieser Phosphatase bekannt⁹³. Um die Calcineurin-Aktivität in Abhängigkeit der Phosphorylierungsstelle Serin 37 des MYOZ2 zu untersuchen, wurde ein NFAT-Reportergen-System verwendet. Die phosphorylierte Form von NFAT stellt ein typisches Substrat der Phosphatase Calcineurin *in vivo* dar, was bereits in vielen Zelltypen nachgewiesen wurde⁹⁴. Die Überexpression von MYOZ2 zusammen mit Calcineurin, für welches erneut die Isoform PPP3CB verwendet wurde, bewirkte nach Stimulation mit Angiotensin II (24 h) eine signifikante Reduktion ($P < 0,05$) der Calcineurin-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (LacZ). Diese negative Regulation der Calcineurin-Aktivität konnte für alle MYOZ2-Proteine beobachtet werden, unabhängig der untersuchten Aminosäure an Position 37 (Abb. 36).

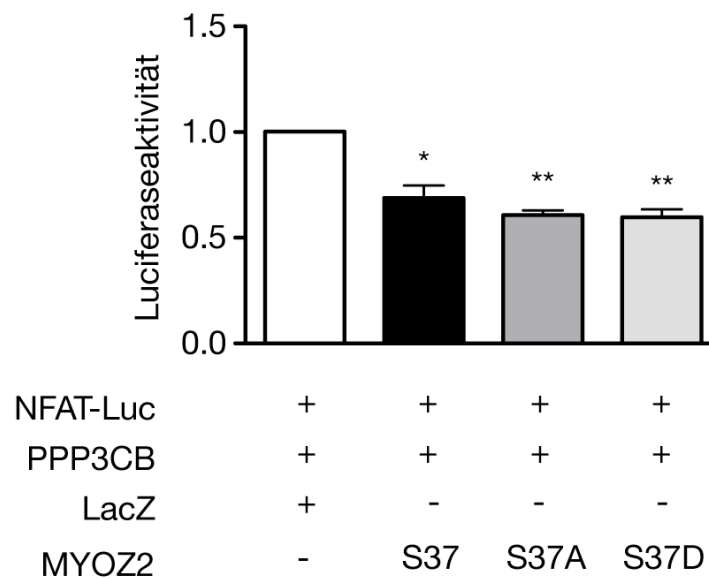


Abbildung 36: NFAT-Luciferase Reporter (NFAT-Luc)-Assay. NRCM wurden mit AdMyoz2 (ifu=50) oder AdLacZ (ifu=50) und AdPpp3cb (ifu=50) infiziert und mit NFAT-Luc transfiziert. Die Zellen wurden für 24 h mit 10 μ M Angiotensin II stimuliert. MYOZ2 senkt im Vergleich zur Kontrolle (LacZ) die Luciferaseaktivität signifikant ($P < 0,05$), jedoch unabhängig von Serin 37 ($n=2$).

3.3 Analyse der Phosphorylierungsstelle Serin 567 im GPSM1

Neben Serin 37 des MYOZ2 wurde in dieser Arbeit die funktionelle Analyse des ebenfalls β -adrenerg regulierten Serin 567 des G protein signaling modulator 1 (GPSM1) durchgeführt. Als strukturelles Merkmal besitzt GPSM1 vier Goloco (*Goloco motif*, *G protein regulatory motif*)-Motive, die einzeln in der Lage sind, $G\alpha_i$ im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zu binden⁹⁵. GPSM1 existiert hauptsächlich in einer langen und einer kurzen Isoform. Beide Isoformen besitzen die C-terminal gelegenen Goloco-Motive, die lange Isoform vier komplette Motive, die kurze drei vollständige und eine verkürzte Version des ersten Goloco-Motivs. Zusätzlich zu den Goloco-Domänen enthält die lange Isoform sieben *Tetratricopeptide repeat* (TRP) Domänen im N-Terminus, ein weit verbreitetes Strukturmotiv, welches Protein-Interaktion vermittelt⁹⁶ (Abb. 37).

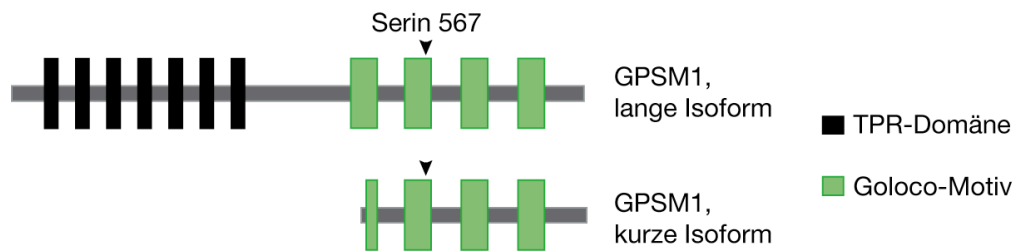


Abbildung 37: Schematische Darstellung der langen und kurzen Isoform des GPSM1-Proteins. Beide Isoformen besitzen die vollständigen letzten drei der vier Goloco-Motive. Serin 567 als Bestandteil des 2. Goloco-Motivs ist ebenfalls dargestellt. Zusätzlich zu den Goloco-Domänen enthält die lange Isoform sieben *Tetratricopeptide repeat* (TRP) Domänen im N-Terminus.

Während die lange Isoform in verschiedenen Geweben, insbesondere im Gehirn exprimiert ist, ist die Expression der kurzen Isoform vor allem auf das adulte Herz beschränkt⁹⁷. Da Serin 567 in kardialen Gewebe identifiziert wurde, erfolgte die weitere funktionelle Analyse von Serin 567 mit der kurzen, in kardialen Gewebe exprimierten Isoform des GPSM1 (Q6IR35, Aminosäure 508-673). Um den Einfluss der Phosphorylierung von Serin 567 zu untersuchen, wurden eine phosphorylierungsdefiziente Mutante, S567A, und zwei phosphorylierungsimitierende Mutanten der kurzen Isoform, S567D und S567E, hergestellt.

3.3.1 *In vitro* Phosphorylierung von Serin 567 nach PKA-Aktivierung

Die Phosphorylierung von Serin 567 des GPSM1 wurde in der adulten Maus als β -adrenerg reguliert nachgewiesen. Um diese β -adrenerge Regulation in einem isolierten zellulären System zu überprüfen, wurde eine *in vitro* Phosphorylierung von Serin 567 in NRCM durchgeführt. GPSM1 S567 sowie GPSM1 S567A wurden als N-terminale HA-Fusionsproteine in NRCM überexprimiert. Nach Inkubation mit radioaktiven [³²P] erfolgte eine fünfminütige Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin, wobei jeweils eine Kontrollgruppe unstimuliert blieb.

Die Autoradiographie der immunopräzipitierten GPSM1-Konstrukte zeigte eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung des GPSM1 S567 nach Forskolin-Stimulation im Vergleich zu gleichbleibender Signalintensität des GPSM1 S567A (Abb. 42). Die PKA-Regulation der Position 567 erfolgt somit ebenfalls im isolierten zellulären System. Neben der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle Serin 567 sind noch weitere Phosphorylierungsstellen im GPSM1 vorhanden, da sowohl GPSM1 S567 als auch GPSM1 S567A autoradiographisch detektiert wurden (Abb. 38).

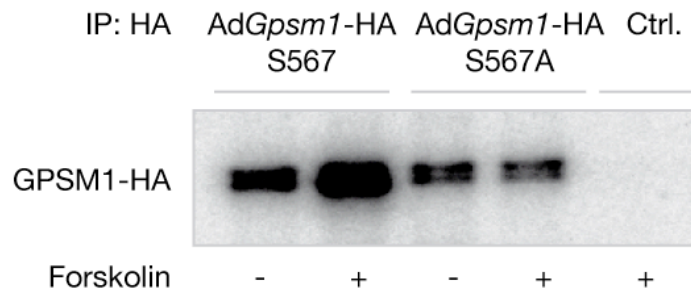


Abbildung 38: Autoradiographie von GPSM1 S567 HA (AdGpsm1 S567-HA, ifu=30) und GPSM1 S567 HA (AdGpsm1 S567A-HA, ifu=30) nach *in vitro* Phosphorylierung mit [32 P] in NRCM. Ein Teil der Zellen wurde jeweils für 5 min mit 10 μ M Forskolin stimuliert, was im Fall des GPSM1 S567 zu einer klaren Zunahme der Phosphorylierung verglichen mit den nicht stimulierten Zellen führte. GPSM1 S567A zeigt nach Stimulation keine Veränderung der Signalintensität.

3.3.2 Interaktion von Goloco S567-Cer, S567A-Cer und S567D-Cer mit G α i-YFP

Die kurze Isoform des GPSM1 besitzt drei vollständige und eine verkürzte Version des ersten Goloco-Motivs. Jedes komplette Goloco-Motiv kann eigenständig ein G α i/t/o-GDP binden. Serin 567 liegt innerhalb des 2. Goloco-Motivs des GPSM1, weshalb der Einfluss dieser Phosphorylierungsstelle auf die Goloco-G α i-Interaktion überprüft wurde. Dafür wurde ein FRET-basiertes System gewählt. Das 2. Goloco Motiv (Aminosäure 546-578, S567, S567A und S567D) wurde mit Cerulean (Cer) am N-Terminus versehen. Für G α i wurde ein YFP (*yellow fluorescent protein*)-markiertes Konstrukt der Arbeitsgruppe Bünemann verwendet, welches YFP zwischen den Aminosäuren 91 und 92 als Insertion enthält. Abbildung 39 zeigt eine Immunofluoreszenz von HEK 293-Zellen, die mit den einzelnen Konstrukten transfiziert wurden. Während G α i-YFP primär an der Zellmembran lokalisiert, sind die Goloco-Motive unabhängig von der jeweiligen Aminosäure an Position 567 über die gesamte Zelle verteilt.

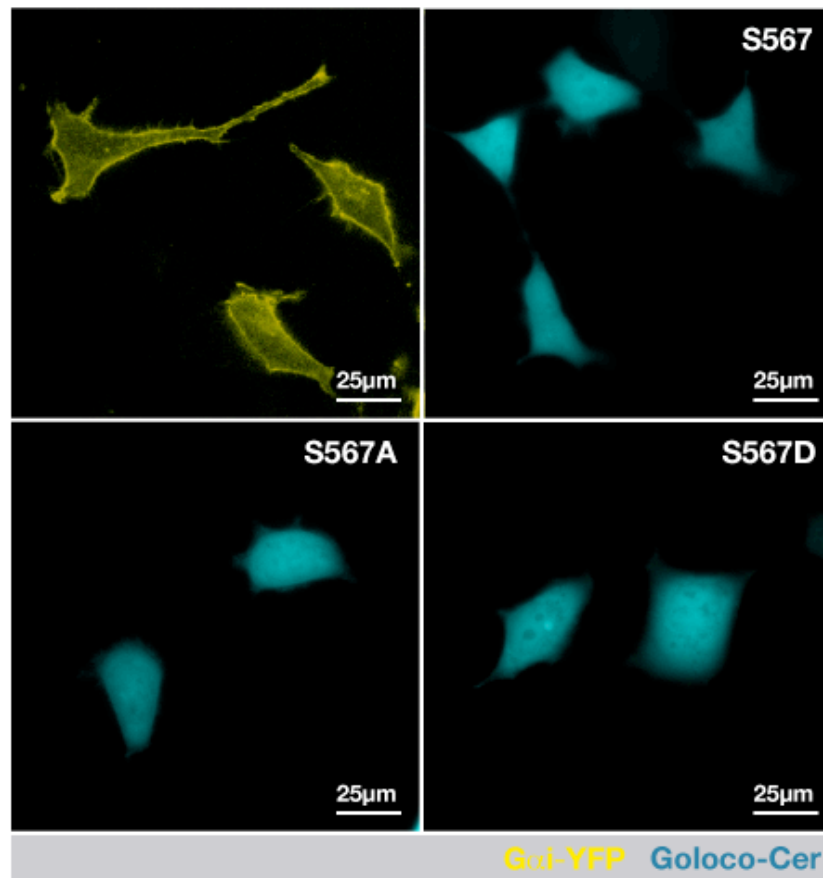


Abbildung 39: HEK 293-Zellen, transfiziert mit $G\alpha i$ -YFP oder den jeweiligen Goloco-Motiven S567, S567A und S567D. $G\alpha i$ -YFP lokalisiert vor allem an der Zellmembran, während die jeweiligen Goloco-Motive sowohl im Zytosol als auch im Zellkern zu sehen sind. Die einzelnen Goloco-Motive zeigen keine Unterschiede in der Lokalisation.

Als erstes wurde sichergestellt, dass das Goloco S567-Cer-Motiv wie beschrieben⁹⁸ in HEK 293-Zellen mit $G\alpha i$ -YFP interagiert. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit Goloco S567-Cer und $G\alpha i$ -YFP co-transfiziert und ein Akzeptor-Photobleichen durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität des Donors (Cer) wurde vor und nach Akzeptor-Photobleichen bestimmt. Wie in Abbildung 40 ersichtlich, nimmt die Donorfluoreszenz nach Photobleichen des Akzeptors (YFP) zu, was sowohl auf eine Interaktion des Goloco S567-Cer und $G\alpha i$ -YFP als auch auf einen stattgefundenen Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren hindeutet.

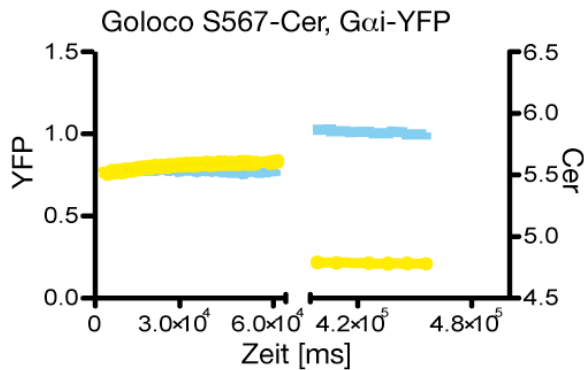


Abbildung 40: Akzeptor-Photobleichen des Goloco S567-Cer und $G\alpha i$ -YFP in co-transfizierten HEK 293-Zellen. Nach Bleichen des Akzeptors (YFP) ist eine Zunahme der Donorfluoreszenz (Cer) zu erkennen, was auf einen erfolgten Energie-transfer von Cer auf YFP vor Akzeptor-Photobleichen hindeutet.

Die Goloco-Motive S567A und S567D wurden in gleicher Weise mittels Akzeptor-Photobleichen untersucht. Sowohl Goloco S567A-Cer- $G\alpha i$ -YFP als auch Goloco S567D-Cer- $G\alpha i$ -YFP zeigten einen Anstieg der Donorfluoreszenz nach Akzeptor-Photobleichen (Abb. 41). Die jeweiligen Goloco-Mutanten des Serin 567 interagieren somit ebenfalls mit $G\alpha i$.

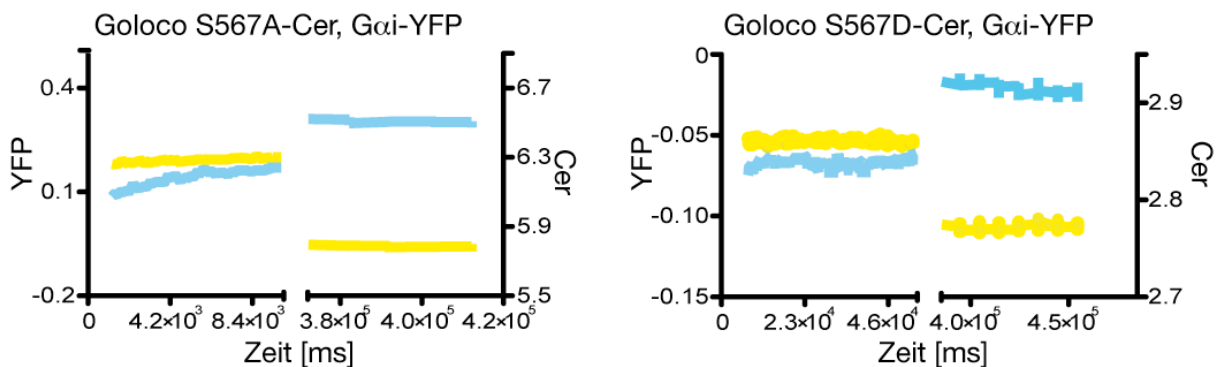


Abbildung 41: Akzeptor-Photobleichen von HEK 293-Zellen, die entweder mit $G\alpha i$ -YFP und Goloco S567A-Cer oder $G\alpha i$ -YFP und Goloco S567D-Cer co-transfiziert wurden. Sowohl die Goloco S567A- als auch die Goloco S567D-Mutante zeigte einen Rückgang der Cer-Intensität nach Akzeptor-Photobleichen.

3.3.3 Aktivierung $G\alpha i$ -gekoppelter Rezeptoren induziert eine Dissoziation des Goloco-Motivs und $G\alpha i$

$G\alpha i$ koppelt nach Aktivierung von GPCRs an den Rezeptor, was typischerweise die Dissoziation des $G\alpha i$ - $G\beta\gamma$ -Komplexes bewirkt⁹⁹. Um mögliche Auswirkungen der GPCR-Aktivierung auf den Goloco-Cer- $G\alpha i$ -YFP-Komplex zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen mit Goloco S567-Cer, $G\alpha i$ -YFP und dem α_{2A} -adrenergen Rezeptor, einem $G\alpha i$ -gekoppelten Rezeptor, transfiziert. Zur Bestimmung der FRET-Ratio unter Rezeptoraktivierung wurden die Zellen über eine Perfusionsvorrichtung mit Puffer überspült, bis sich eine konstante Basisratio (Ratio YFP/Cer) einstellte. Über das Perfusionssystem erfolgte anschließend die Ap-

plikation von Noradrenalin (NA), ein Agonist des α_{2A} -adrenergen Rezeptors. Die NA-Applikation bewirkte eine Abnahme der FRET-Ratio, welche durch Auswaschen des Liganden mit Puffer wieder auf den Basiswert zurückgeführt werden konnte (Abb. 42, linke Abbildung). Die reversible Erniedrigung der FRET-Ratio nach NA-Applikation ist auf eine Verringerung der Energieübertragung von Cer auf YFP zurückzuführen, was bei Betrachtung der YFP- und Cer-Intensität deutlich wird. (Abb. 42, rechte Abbildung). Diese Dissoziation der Fluorophore konnte nur nach Co-Transfektion und Aktivierung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors beobachtet werden und ist somit rezeptorabhängig.

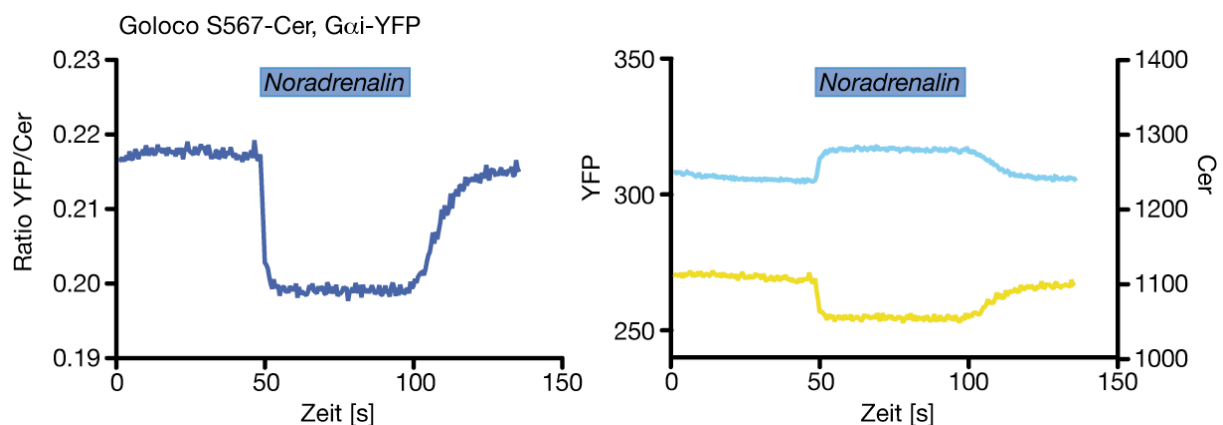


Abbildung 42: FRET-Ratio von HEK 293-Zellen, die mit Goloco S567-Cer, G α i-YFP und dem α_{2A} -adrenergen Rezeptor co-transfiziert wurden. Der Wechsel von Puffer auf 2 μ M Noradrenalin (NA) bewirkt die Dissoziation der Fluorophore, was neben dem Absinken der FRET-Ratio (linke Abbildung) an der Zunahme der Cer- und Abnahme der YFP-Intensität (rechte Seite) zu erkennen ist. Das Auswaschen des NA führt zu einer Reassoziation der Fluorophore.

In gleicher Weise wie für Goloco S567-Cer konnte die NA-induzierte reversible Dissoziation der Fluorophore für die Goloco-Motive S567A-Cer und S567D-Cer Motive beobachtet werden. Die Mutation von Serin 567 zu Alanin oder Aspartat kann somit weder die Bindung des Goloco-Motivs zu G α i noch die rezeptoraktivitätsvermittelte Dissoziation des Goloco-G α i Komplexes verhindern.

3.3.4 Einfluss β -adrenerger Signalwege auf die Goloco-G α i-Dissoziation

3.3.4.1 Inhibition der Reassoziation des Goloco-G α i-Komplexes durch 8-Bromo cAMP

Da die Möglichkeit besteht, dass die S567D-Mutation die Phosphorylierung des Serin 567 nicht richtig imitiert, wurde die rezeptoraktivitätsabhängige Dissoziation des Goloco S567-Cer-G α i-YFP-Komplexes und des Goloco S567A-Cer-G α i-YFP-Komplexes in Gegenwart

von PKA-aktivierenden Stimuli in HEK 293-Zellen verglichen. Zur Aktivierung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors wurde Clonidin verwendet. Die Aktivierung der PKA-vermittelten Signalwege erfolgte rezeptorunabhängig durch 8-Bromo-cAMP, ein zellpermeables Analogon des endogenen cAMP. Die alleinige Gabe von 8-Bromo-cAMP bewirkte keine Dissoziation des Goloco-Cer-G α i-YFP-Komplexes. Nach gemeinsamer vorangehender Applikation mit Clonidin konnte die Rückkehr der FRET-Ratio auf den ursprünglichen Wert durch 8-Bromo-cAMP verhindert werden. Nach Puffergabe kam es zu einer Assoziation beider Proteine, die jedoch, vermutlich aufgrund der intrazellulären Anreicherung von 8-Bromo-cAMP, vergleichsweise langsam verlief. Dieses 8-Bromo-cAMP-vermittelte Phänomen scheint allerdings nicht mit der Phosphorylierung am Serin 567 zusammenzuhängen, da sowohl das Goloco S567-Motiv als auch die S567A-Mutante dieses Verhalten zeigte (Abb. 43). Möglich wäre eine S567-unabhängige cAMP-vermittelte Modifikation oder Konformationsänderung der an der Goloco-Cer-G α i-YFP-Dissoziation beteiligten Komponenten.

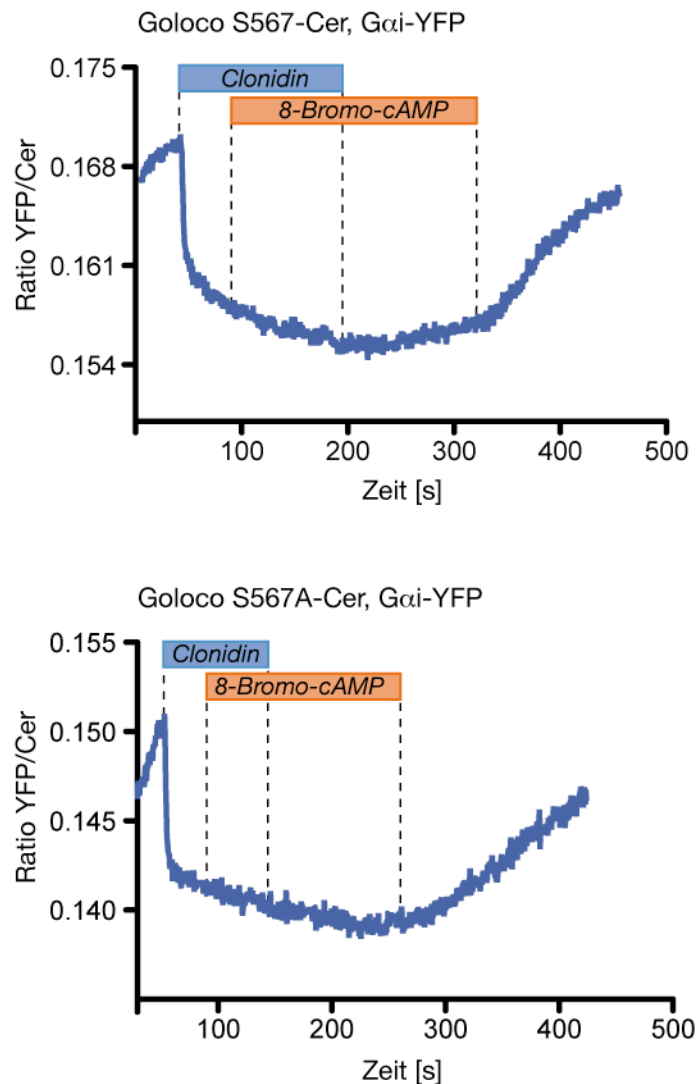


Abbildung 43: FRET-Ratioänderung in HEK 293-Zellen, die mit Goloco-S567-Cer oder Goloco-S567A-Cer, Gαi-YFP und α_{2A} -Rezeptor co-transfiziert wurden. Durch Clonidin-Applikation erfolgt die Dissoziation des Goloco-Gαi-Komplexes. 8-Bromo-cAMP-Zugabe verhindert die Reassoziierung des Komplexes, welche durch alleinige Puffer-Gabe erfolgt.

3.3.4.2 Einfluss der Aktivierung β -adrenerger Signalwege auf die Goloco-Gαi-Interaktion

Um die Goloco-Gαi-Interaktion nicht nur auf die Betrachtung einzelner Zellen in der FRET-Messung zu beschränken, wurden CoIP-Experimente in HEK 293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils Gαi-V5 mit Goloco-S567-Cer oder Goloco S567A-Cer und dem α_{2A} -adrenergen Rezeptor co-transfiziert. Vor Zellyse erfolgte eine fünfminütige Stimulation der Zellen mit Forskolin oder NA, eine Vergleichsgruppe blieb jeweils unstimuliert. Wie in Abbildung 44 ersichtlich, fand sowohl zwischen dem Goloco S567-Motiv als auch der S567A-Mutante eine vergleichbare Interaktion mit Gαi-V5 statt. Die vorangegangene Stimulation zeigte in wiederholten CoIP-Experimenten keine klaren Unterschiede zwischen dem Goloco

S567-Motiv und der S567A-Mutante. Die Goloco-G α i-Dissoziation nach NA-Stimulation war in den CoIP-Experimenten nur sehr selten sichtbar. Eine Erklärung könnte sein, dass nach Überexpression von Goloco und G α i weitaus mehr Goloco-G α i interagiert, als letztendlich an die Rezeptoren koppeln kann. Eine Reassoziierung während der Lysatpräparation ist ebenfalls in Erwägung zu ziehen.

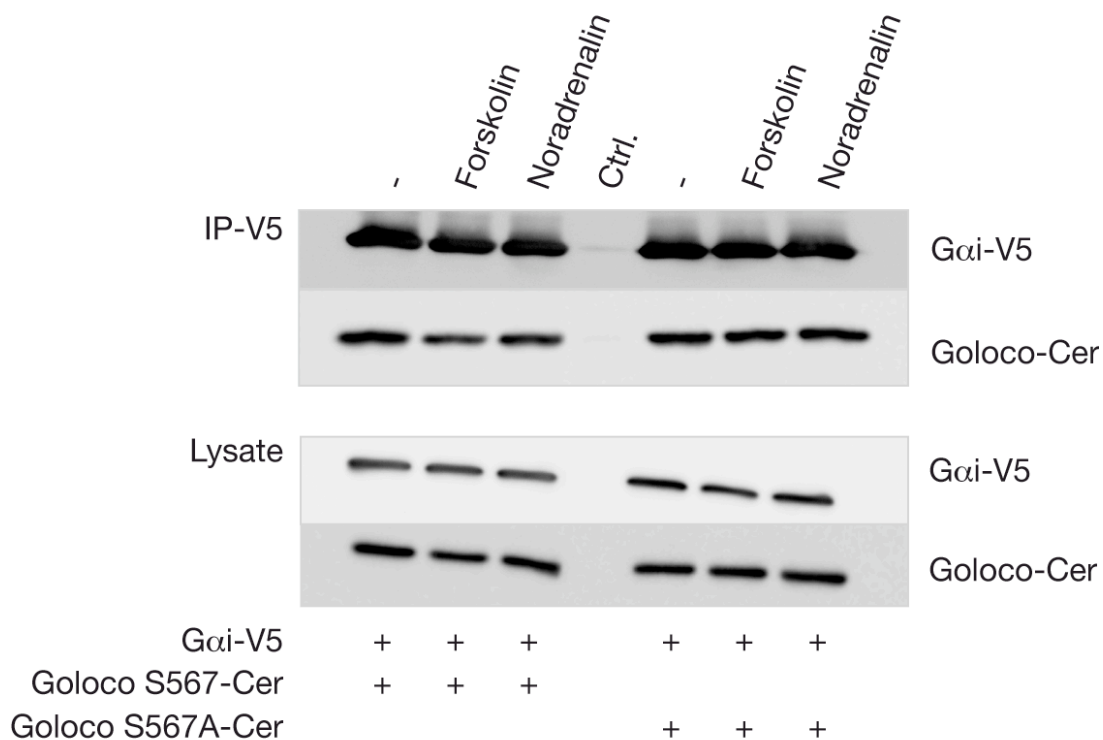


Abbildung 44: IP von G α i-V5, das in HEK 293-Zellen mit Goloco S567-Cer oder Goloco S567A-Cer und dem α_{2A} -adrenergen Rezeptor co-transfiziert wurde. Das Goloco S567-Motiv als auch das S567A Goloco-Motiv zeigen keine Unterschiede in der Interaktion mit G α i-V5.

3.3.5 Einfluss der Phosphorylierung von Serin 567 auf die Dissoziation des G α i-Goloco-Komplexes in NRCM

Die Abhängigkeit der Goloco-G α i-Dissoziation von Serin 567 wurde neben den HEK 293-Zellen zusätzlich in NRCM untersucht. Abbildung 45 zeigt NRCM, die entweder mit AdG α i-YFP oder AdGoloco S567/S567A-Cer infiziert wurden. Die jeweiligen Proteine weisen klare Unterschiede in der zellulären Lokalisation auf. Während G α i-YFP an der Zellmembran, aber auch im Zytosol lokalisiert, kann Goloco S567/S567A-Cer im Zytosol und im Zellkern der NRCM detektiert werden.

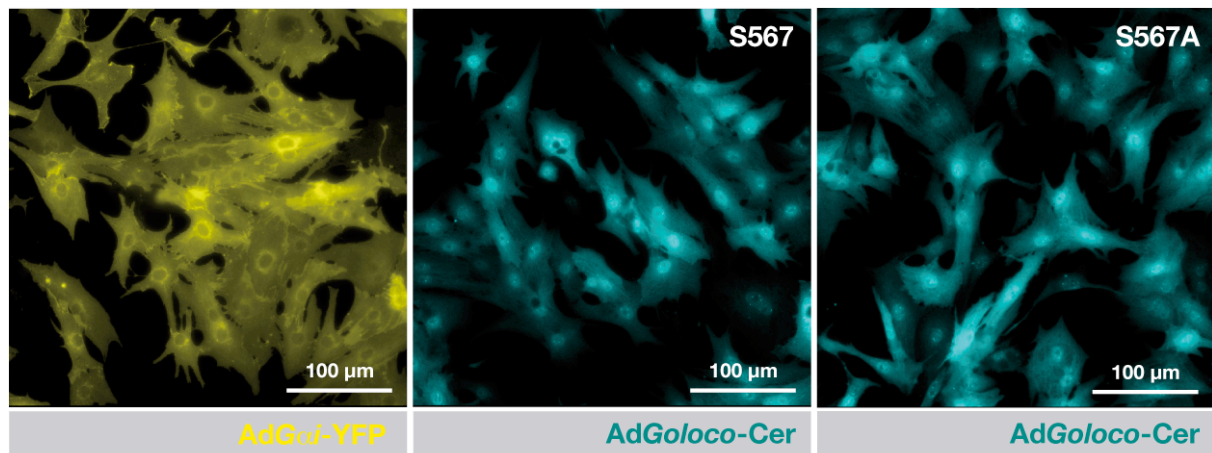


Abbildung 45: NRCM, die mit $G\alpha_i$ -YFP oder Goloco S567/S567A-Cer infiziert wurden. Die Goloco-Motive lokalisieren vornehmlich im Zytosol und Zellkern, während $G\alpha_i$ -YFP an der Zellmembran, aber auch im Zytosol zu finden ist.

Die Untersuchung der Dissoziation des Goloco-Cer- $G\alpha_i$ -YFP-Komplexes in HEK 293-Zellen erforderte die Co-Transfektion eines $G\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptors. In NRCM konnten die endogenen muskarinergen M2 Acetylcholin-Rezeptoren genutzt werden, zu deren Aktivierung Carbachol (CCH) verwendet wurde. Nach Aktivierung der M2-Rezeptoren konnte wie zuvor in den HEK 293-Zellen die reversible Dissoziation des Goloco-Cer- $G\alpha_i$ -YFP-Komplexes beobachtet werden. Um den Einfluss β -adrenerger Signalwege auf die Goloco-Cer- $G\alpha_i$ -YFP-Dissoziation zu untersuchen, wurden die endogenen β -Rezeptoren mit Isoprenalin stimuliert. Die Isoprenalin-Applikation zur Aktivierung endogener β -Rezeptoren bewirkte keine Veränderung der basalen FRET-Ratio. Nur in Ausnahmefällen konnte eine leichte Abnahme der FRET-Ratio verzeichnet werden. Weder nach vorangegangener CCH-Stimulation noch Vorstimulation zusammen mit CCH vermochte die Isoprenalin-Gabe die Dissoziation des $G\alpha_i$ -YFP-Goloco-Cer Komplexes zu induzieren oder aufrecht zu erhalten (Abb. 46).

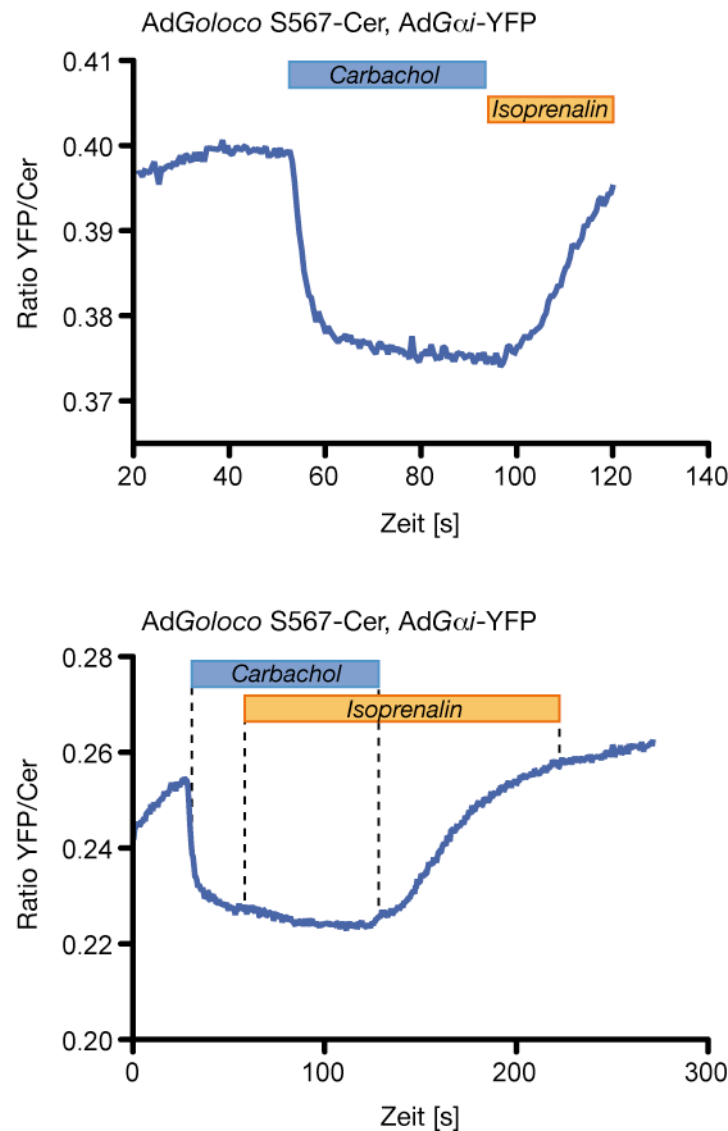


Abbildung 46: FRET-Ratioänderung des Goloco-Cer-Gαi-YFP-Komplexes nach CCH-Stimulation in NRCM. Die Zugabe von Isoprenalalin verhielt sich analog zur Puffergabe, es erfolgte die Reassoziierung des Goloco-Cer-Gαi-YFP-Komplexes (Kurve oben). Auch die Vorstimulation mit CCH konnte die Dissoziation des Komplexes nicht aufrecht erhalten (Kurve unten).

Während die 8-Bromo-cAMP-Applikation in HEK 293-Zellen eine Reassoziierung des Goloco-Cer-Gαi-YFP-Komplexes nach vorangegangener CCH-Stimulation verhinderte, hatte 8-Bromo-cAMP in NRCM keinen Einfluss auf die Goloco-Cer-Gαi-YFP-Reassoziierung. Weder alleine noch mit vorangegangener CCH-Costimulation vermochte 8-Bromo-cAMP die Reassoziierung des Goloco-Cer-Gαi-YFP-Komplexes zu inhibieren (Abb. 47). Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Experimenten in HEK 293-Zellen, wo die Applikation von 8-Bromo-cAMP die Reassoziierung des Goloco-Cer-Gαi-YFP-Komplexes verhinderte (Abb. 43).

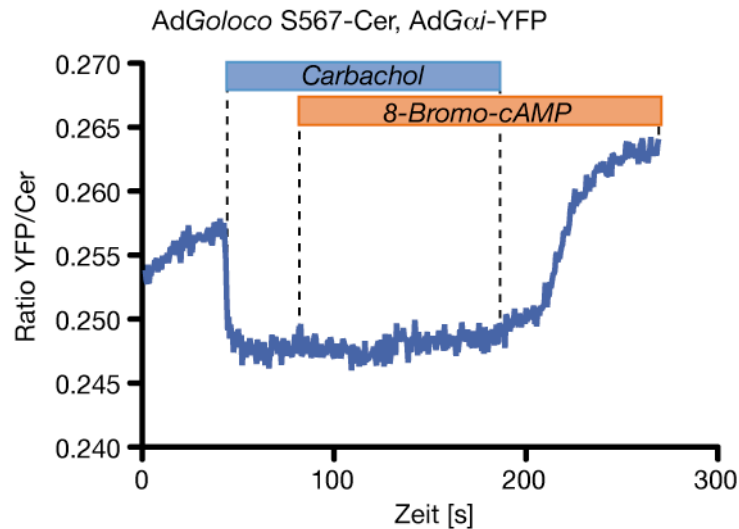


Abbildung 47: FRET-Ratio des Goloco-Cer-G α i-YFP-Komplexes in NRCM nach CCH-induzierter Stimulation und nachfolgender 8-Bromo-cAMP-Applikation. Im Gegensatz zu den Versuchen in HEK 293-Zellen führte die 8-Bromo-cAMP-Stimulation zur Reassoziierung des Komplexes.

3.3.6 Dissoziation von Goloco-Cer-G α i-YFP nach Überexpression β_1 -adrenerger Rezeptoren

Die Isoprenalin-Stimulation endogener β -adrenerger Rezeptoren zeigte keine oder in Ausnahmefällen nur eine sehr geringe Änderung der FRET-Ratio. Um mögliche Limitationen aufgrund zu geringer endogener Rezeptorzahlen auszuschließen, erfolgte eine zusätzliche Überexpression β_1 -adrenerger Rezeptoren. Zellen, die nach CCH-Applikation eine Dissoziation des Goloco-Cer-G α i-YFP Komplexes zeigten, taten dies sich nun in gleicher Weise nach Isoprenalin-Stimulation (Abb. 48). Die Goloco S567A-Cer-Variante dissoziierte ebenfalls nach Isoprenalin-Applikation, weshalb die Isoprenalin-induzierte Dissoziation nicht durch eine Phosphorylierung von Serin 567 bedingt war. Eine nicht-physiologische Kopplung von G α i-YFP an die überexprimierten β_1 -adrenergen Rezeptoren kann nicht ausgeschlossen werden.

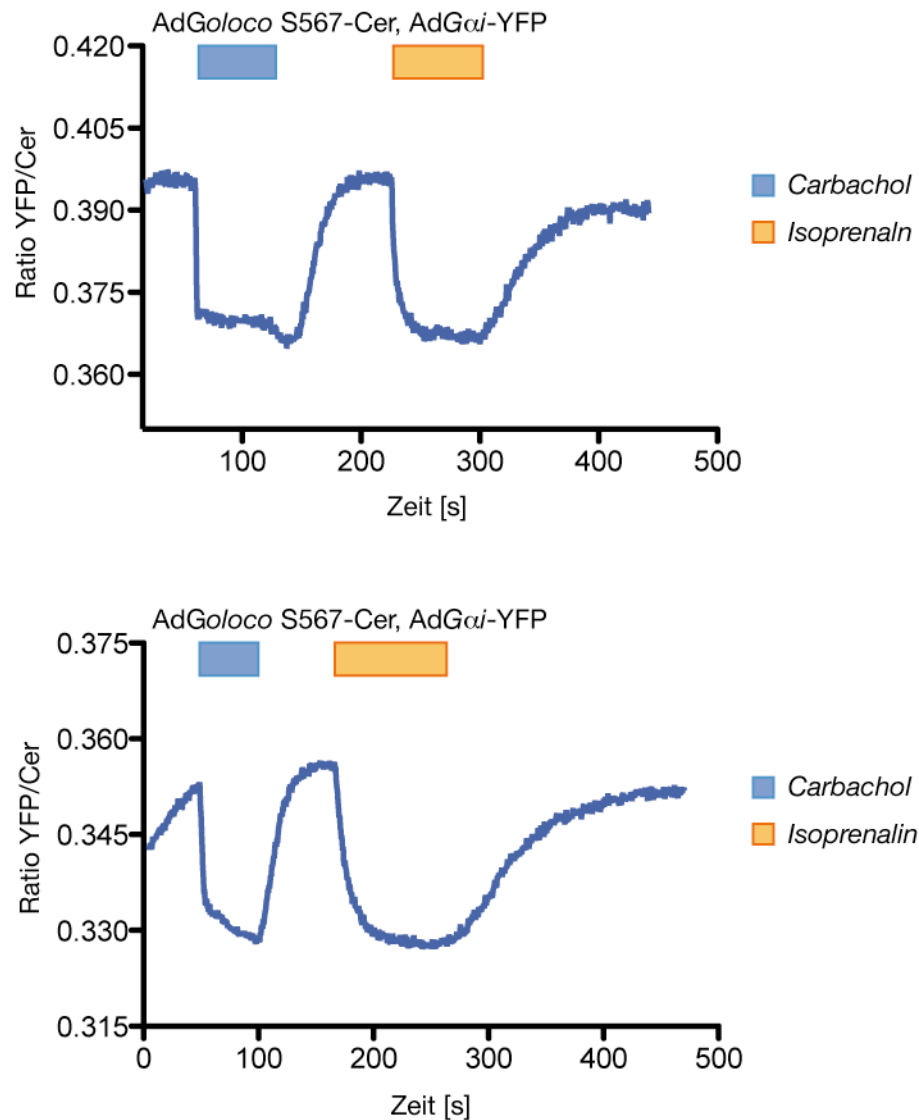


Abbildung 48: FRET-Ratioänderung in NRCM nach Co-Expression von Goloco S567-Cer (Graph oben) oder Goloco S567A-Cer (Graph unten) und Gαi-YFP zusammen mit β₁-adrenergen Rezeptoren. Sowohl nach CCH-Applikation als auch Isoprenalin-Stimulation erfolgte eine reversible, S567-phosphorylierungsunabhängige Dissoziation des Goloco-Cer-Gαi-YFP-Komplexes.

3.3.7 Dissoziation von GPSM1-Cer-Gαi-YFP nach GPCR-Aktivierung in NRCM

Das Goloco-Motiv stellt zwar die Bindedomäne für Gαi dar, repräsentiert ansonsten aber nur einen kleinen Teil des GPSM1-Proteins. Möglicherweise findet im zellulären Kontext keine Phosphorylierung des isolierten Motivs statt. Zudem lässt die thermodynamische Charakterisierung der vier Goloco-Motive im C-Terminus des GPSM1 einen synergistischen Einfluss der Goloco-Motive untereinander vermuten¹⁰⁰ (Abb. 37). Um mögliche Limitationen des isolierten Goloco-Motivs zu vermeiden, wurden FRET-Experimente mit der kurzen Isoform des GPSM1 durchgeführt. GPSM1 S567, S567A, S567D und S567E, eine weitere die

S567-Phosphorylierung imitierende Mutante, wurden dazu mit Cer am C-Terminus fusioniert.

Die Infektion der jeweiligen Konstrukte in NRCM ließ keine S567-bedingten Unterschiede in der Lokalisation der einzelnen GPSM1-Cer-Varianten erkennen. Im Vergleich zu der Lokalisation des einzelnen Goloco-Motivs waren alle GPSM1-Cer-Konstrukte verstärkt im Zytosol zu finden, zu einem geringen Anteil ebenso wie die Goloco-Motive im Zellkern (Abb. 49).

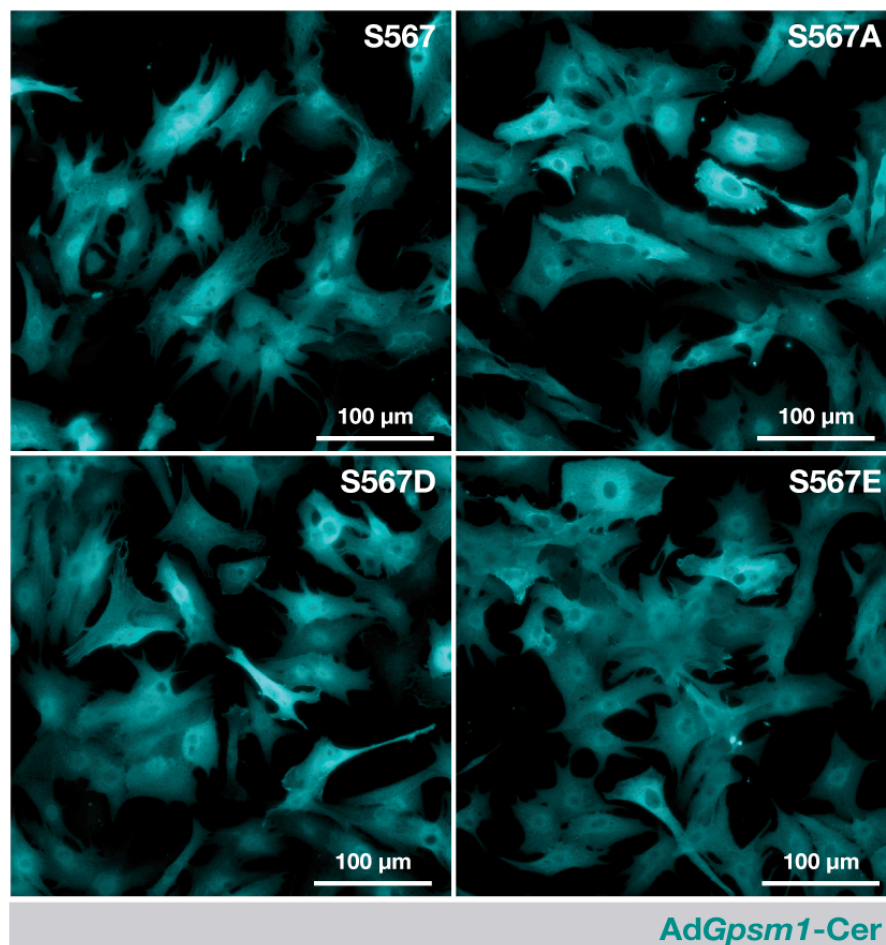


Abbildung 49: Expression der GPSM1-Cer-Proteine in NRCM. Der Aminosäureaustausch an Position 567 bewirkte keine Unterschiede in der zellulären Lokalisation.

GPSM1-Cer zeigte bei Co-Expression von $G\alpha i$ -YFP nach CCH-induzierter Rezeptoraktivierung ebenfalls eine Abnahme der FRET-Ratio, die auf eine Dissoziation des GPSM1-Cer- $G\alpha i$ -YFP-Komplexes schließen lässt. Diese FRET-Ratioänderung konnte für alle GPSM1-Cer-Varianten beobachtet werden, unabhängig der Aminosäure an Position 567 (Abb. 50).

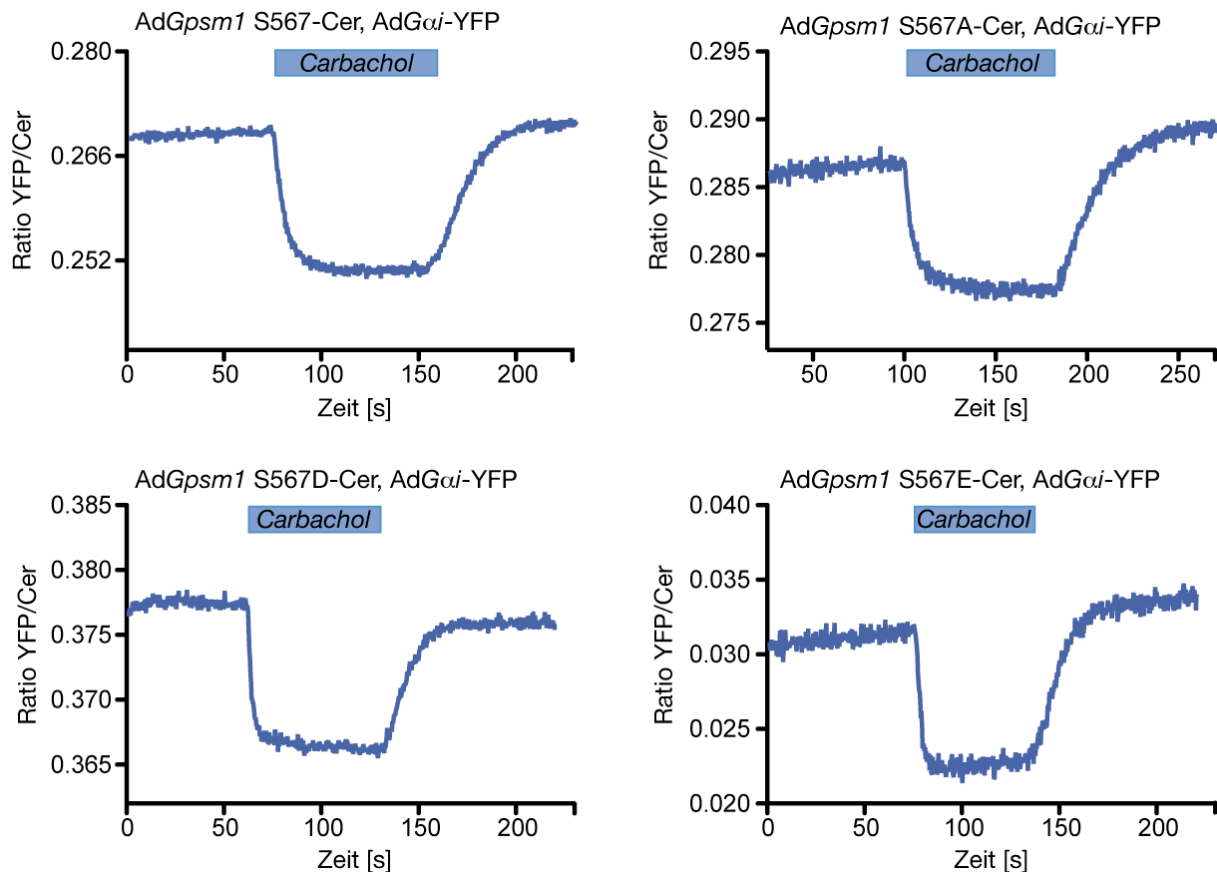


Abbildung 50: FRET-Ratio der vier GPSM1-Cer Proteine und G α i-YFP in NRCM. Nach CCH-Aktivierung endogener G α i-gekoppelter Rezeptoren zeigen sowohl GPSM1 S567 als auch S567A, S567D und S567E eine reversible Abnahme der FRET-Ratio.

3.3.8 Quantitative Analyse der GPSM1-Cer-G α i-YFP-Dissoziation in Abhängigkeit von Serin 567

Bisher wurde ausschließlich überprüft, ob die Änderung der Aminosäure Serin 567 zu Alanin, Aspartat oder Glutamat die rezeptorbedingte Aktivierung des GPSM1-Cer-G α i-YFP Komplexes ermöglicht, allerdings nicht das Ausmaß dieser FRET-Ratioänderung. Um einen eventuellen Einfluss von Serin 567 auf die Höhe dieser FRET-Ratioänderung zu erfassen, erfolgte eine Quantifizierung der FRET-Ratio nach CCH-Applikation. Diese Quantifizierung wurde zum Teil von Stephan Nothjunge durchgeführt, dessen Bachelorarbeit im Rahmen dieser Promotionsarbeit von mir betreut wurde¹⁰¹.

Bei der quantitativen FRET-Analyse konnten geringe Abweichungen der Proteinlevel der GPSM1-Cer/G α i-YFP-Konstrukte sowohl zwischen den einzelnen Zellen als auch innerhalb einer Zelle nicht ausgeschlossen werden. Generell wurde darauf geachtet, nur Zellen mit vergleichbaren basalen YFP- und Cer-Intensitäten für die Messungen zu verwenden. Die Änderung der FRET-Ratio wurde als Differenz der Basisratio und der FRET-Ratio unter Re-

zeptoraktivierung mit CCH bestimmt (Δ FRET). Während der GPSM1 S567-Cer-G α i-YFP-Komplex die stärkste Dissoziation nach Rezeptoraktivierung aufwies, wurde für die S567A- und S567D-Mutante eine etwas geringere FRET-Ratiodifferenz detektiert. Δ FRET der S567E-Mutante war signifikant geringer ($P < 0,05$), verglichen mit GPSM1 S567 und S567A (Abb. 51 (A)).

Zusätzlich zur Quantifizierung der einzelnen Mutanten wurde ein Vergleich der FRET-Ratioänderung von GPSM1 S567 und GPSM1 S567A unter basalen Bedingungen und Forskolin-induzierter PKA-Stimulation durchgeführt. Unabhängig der zusätzlichen PKA-Aktivierung zeigte S567A erneut eine schwächere FRET-Ratioänderung nach CCH-Applikation verglichen mit GPSM1 S567. Die zusätzliche Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin bewirkte einen leichten Anstieg der Ratioänderung, was allerdings sowohl für S567 als auch S567A beobachtet werden konnte (Abb. 51 (B)). Das tendenziell erhöhte Δ FRET unter phosphorylierungsinduzierenden Bedingungen steht in klarem Kontrast zu der geringeren FRET-Ratioänderung der Mutanten GPSM1 S567D- und GPSM1 S567E, welche beide die Phosphorylierung von Serin 567 imitieren sollen (Abb. 51 (A)).

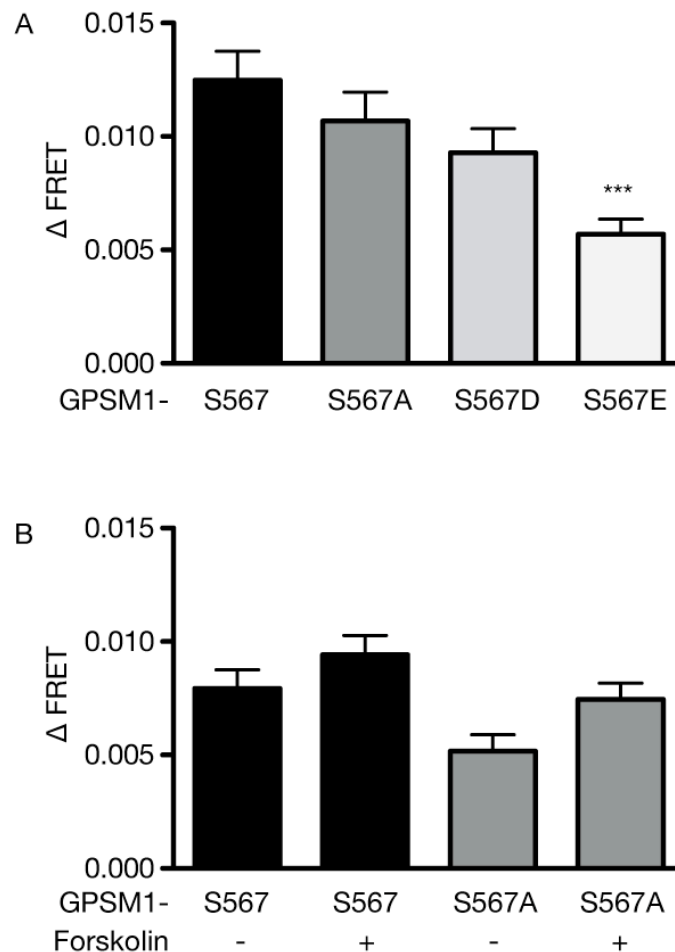


Abbildung 51: (A) Quantifizierung der FRET-Ratioabnahme des GPSM1-Cer-Gαi-YFP Komplexes nach GPCR-Aktivierung in NRCM. Verglichen mit GPSM1 S567 und GPSM1 S567A zeigt GPSM1 S567E eine signifikant geringere ($P < 0,05$) Änderung der FRET-Ratio verglichen mit GPSM1 S567 und GPSM1 S567A. Für GPSM1 S567 wurden $n=25$ Zellen, für GPSM1 S567A $n=15$, für GPSM1 S567D $n=19$ und für GPSM1 S567E $n=19$ Zellen vermessen. (B) Quantitative Analyse der FRET-Ratioänderung von GPSM1 S567 und GPSM1 S567A unter basalen Bedingungen oder Forskolin-Inkubation (10 μ M). Für GPSM1 S567 (- Forskolin) wurden $n=23$ Zellen, für GPSM1 S567 (+ Forskolin) $n=27$ Zellen, für GPSM1 S567A (- Forskolin) $n=13$ Zellen und für GPSM1 S567A (+ Forskolin) $n=21$ Zellen analysiert.

3.3.9 Anstieg der basalen Phosphorylierung von ERK1/2 nach Überexpression von GPSM1

Der Goloco-Gαi-GDP-Komplex ist frei von Gβγ. Um den Einfluss von GPSM1 und den jeweiligen Mutanten auf Gβγ-vermittelte Signalwege zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Überexpression von GPSM1 betrachtet. Neben der basalen Phosphorylierung von ERK1/2 wurde die ERK1/2-Phosphorylierung nach fünfminütiger Rezeptorstimulation mit CCH allein oder mit CCH zusammen mit Forskolin analysiert. Die Überexpression von GPSM1-HA erhöhte die basale ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (LacZ), allerdings ohne Unterschiede der einzelnen GPSM1-Proteine unterein-

ander. Eine CCH-induzierte Stimulation der ERK1/2-Phosphorylierung war deutlich zu erkennen, jedoch in gleichem Ausmaß wie in der Kontrolle. Auch der Forskolin-Zusatz bewirkte keine Unterschiede in der Höhe der ERK1/2-Phosphorylierung zwischen den GPSM1 Proteinen untereinander sowie zu der Kontrolle. Die Proteinkonzentrationen von ERK1/2 blieben durch die Überexpression von GPSM1 unverändert (Abb. 52 (A und B)).

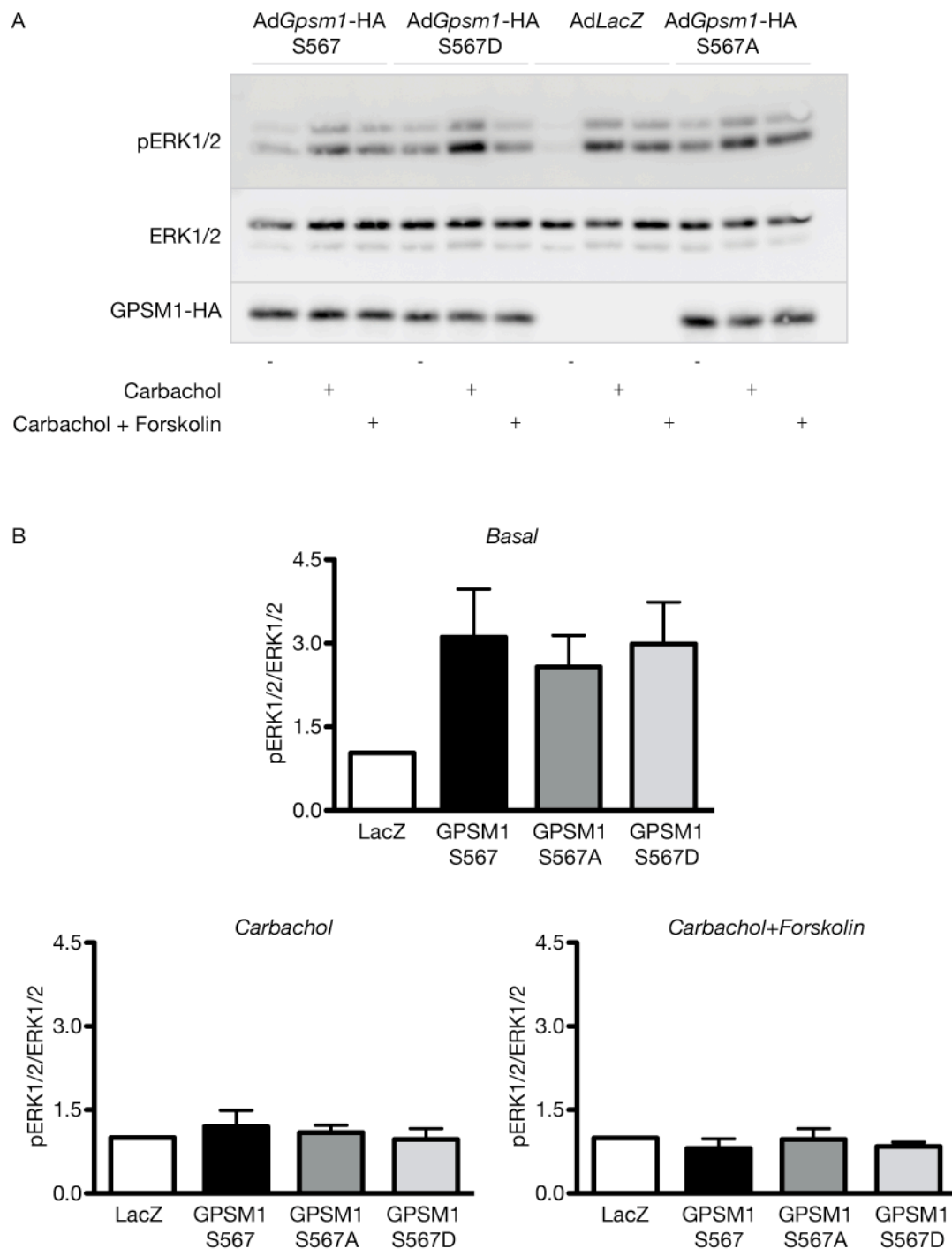


Abbildung 52: Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 in NRCM nach Überexpression von GPSM1 S567-HA und der S567A- oder S567D-Mutante (AdGpsm1-HA, ifu=50). (A) Repräsentativer Western-Blot der ERK1/2-Phosphorylierung. Unter basalen Bedingungen (serumfreies Medium, 3 h) ist eine klare Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung nach Überexpression aller GPSM1-HA-Proteine verglichen mit der Kontrolle (AdLacZ, ifu=50) zu erkennen. Nach Stimulation (5 min) mit 300 μ M CCH oder 300 μ M CCH zusammen mit 10 μ M Forskolin ist kein Unterschied der ERK1/2-Phosphorylierung ersichtlich. Es sind keine Unterschiede in den Proteinkonzentrationen von ERK1/2 zu verzeichnen. (B) Die Quantifizierung der ERK1/2-Phosphorylierung von fünf Western Blots bestätigt die gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung nach GPSM1-HA Überexpression unter basalen Bedingungen.

3.3.10 Verdrängung von $G\beta\gamma$ aus der $G\alpha_i$ -Bindung durch Überexpression von GPSM1

Eine Erklärung für die erhöhte basale ERK1/2-Phosphorylierung wäre die bereit bekannte Verdrängung der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aus dem $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$ -Komplex¹⁰². Um zu testen, ob alle GPSM1-Konstrukte in der Lage sind, die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aus dem $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$ -Komplex zu verdrängen, wurde in CoIP-Experimenten die Interaktion von endogenem $G\beta\gamma$ und $G\alpha_i$ -V5 in Anwesenheit von GPSM1 untersucht. Hierfür wurden HEK 293-Zellen mit dem jeweiligen GPSM1-HA-Konstrukt und $G\alpha_i$ -V5 co-transfiziert. Nach IP von $G\alpha_i$ -V5 wurde GPSM1-HA und $G\beta$ betrachtet. Abbildung 57 zeigt deutlich, dass bei Überexpression von GPSM1-HA das endogene $G\beta$ aus dem $G\alpha_i$ -Komplex verdrängt wird. Alle vier GPSM1-HA-Varianten waren in der Lage, kompetitiv mit $G\beta$ an $G\alpha_i$ zu binden (Abb. 53). Eine quantitative Auswertung der Bindung von GPSM1-HA zu $G\alpha_i$ -V5 in Abhängigkeit der Aminosäure an Position 567 konnte nicht vorgenommen werden, da die drei durchgeführten Western Blots starke Schwankungen der GPSM1-Expression innerhalb der untersuchten GPSM1-HA Proteine aufwiesen.

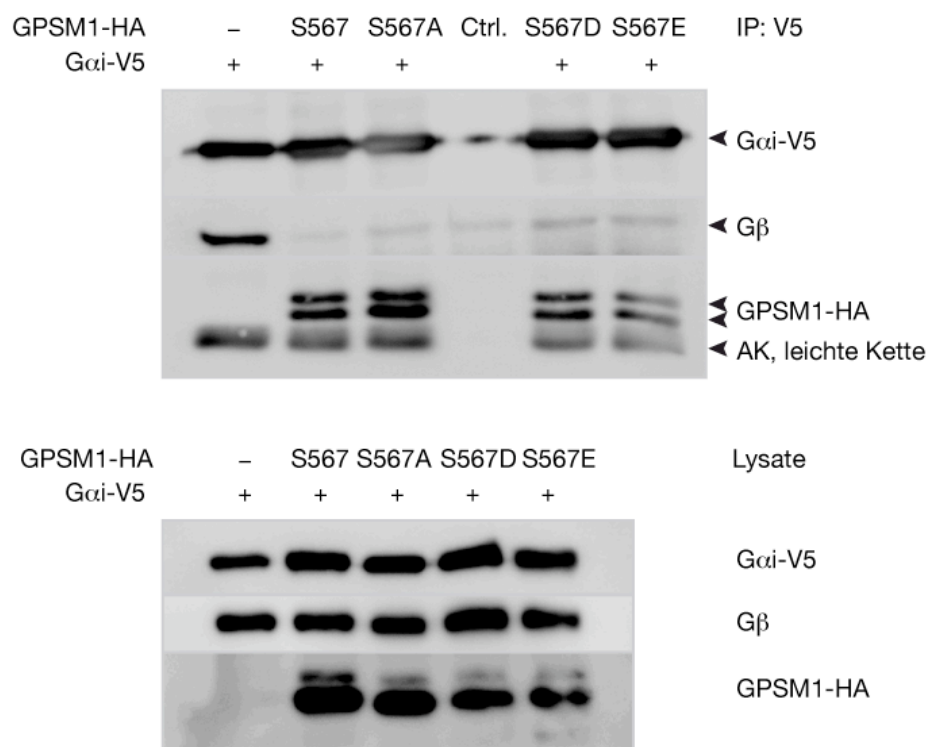


Abbildung 53: Co-Immunopräzipitation von $G\alpha_i$ -V5, GPSM1-HA und $G\beta$ in HEK 293-Zellen. Unabhängig der Aminosäure an Position 567 konnten alle GPSM1-HA Proteine das endogene $G\beta$ aus dem $G\alpha_i$ -Komplex verdrängen ($n=3$). Der gezeigte Western-Blot wurde von Stephan Nothjunge im Zuge seiner Bachelorarbeit durchgeführt¹⁰¹.

3.3.11 Regulation der subzellulären Lokalisation von GPSM1-HA in NRCM

Phosphorylierung ist häufig an der Regulation der zellulären Lokalisation von Proteinen beteiligt. Um Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von GPSM1 in Abhängigkeit der Phosphorylierungsstelle Serin 567 zu überprüfen, wurde eine Immunofluoreszenz von GPSM1-HA (S567, S567A und S567D) in NRCM durchgeführt.

Unter basalen Bedingungen (Kontrolle, 0,1% FCS) zeigten alle GPSM1-Varianten, unabhängig von Serin 567 eine ausgeprägte nukleäre Lokalisation. Die nukleäre Lokalisation konnte mit Leptomycin B, einem nukleären Export-Inhibitor, weiter verstärkt werden. Die Aktivierung $G\alpha_s$ - oder $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren mit Isoprenalin oder Phenylephrin bewirkte eine Verschiebung der GPSM1-Proteine vom Nukleus in das Zytosol. Diese Lokalisationsänderung fand für alle GPSM1-HA-Proteine unabhängig von Serin 567 statt (Abb. 54).

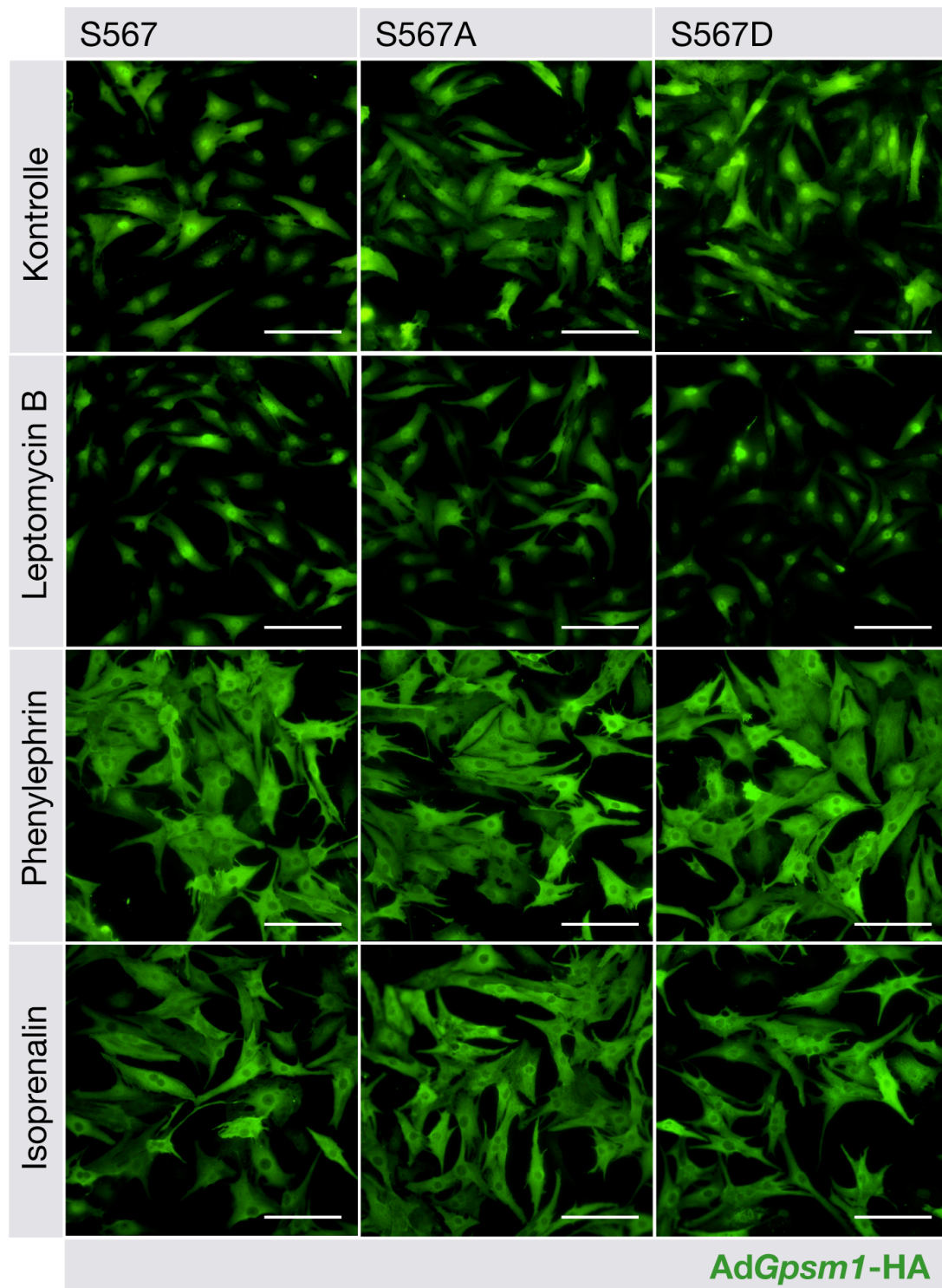


Abbildung 54: Immunofluoreszenz von NRCM, die mit den verschiedenen AdGpsm1-HA-Konstrukten (ifu=20) infiziert wurden (Vergrößerung 40x, Maßeinheit 100 μ M). Die Färbung erfolgte mit einem HA-spezifischen Antikörper. Die Zellen wurden jeweils für 12 h unstimuliert, in 2 nm LMB, in 50 μ M Phenylephrin oder 10 μ M Isoprenalin in 0,1% FCS gehalten. Die Stimulation der Zellen mit Phenylephrin oder Isoprenalin bewirkte eine Lokalisation von GPSM1 im Zytosol. LMB hielt GPSM1 im Nukleus zurück.

4 Diskussion

4.1 Analyse des kardialen β -adrenergen Phosphoproteoms

Die Phosphorylierung von Proteinen gehört zu den zellulär mit am häufigsten genutzten posttranslationalen Modifikationen und steht auch in der Statistik aller experimentell detektierten posttranslationalen Modifikationen der Swiss-Prot Datenbank an erster Stelle (<http://selene.princeton.edu/PTMCuration>). Die β -adrenergen Rezeptoren des Herzens vermitteln den katecholaminergen Einfluss auf die kardiale Kontraktion und Relaxation maßgeblich über eine Veränderung des zellulären Phosphorylierungsmusters¹⁰³. Das gesamte Netzwerk β -adrenerger Signaltransduktion ist bislang wahrscheinlich nur zu einem kleinen Teil bekannt, was daran liegt, dass zu diesem Zweck nur wenig systematische Ansätze durchgeführt wurden, die zudem nur einen kleinen Teil des β -adrenergen Phosphoproteoms erfassten¹⁰⁴. Um weitere Einblicke in die kardiale β -adrenerge Signaltransduktion zu gewinnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Charakterisierung des kardialen Phosphoproteoms mit differenzieller Analyse des Phosphorylierungsmusters unter β -adrenerger Stimulation und Inhibition vorgenommen.

Abbildung 55 zeigt den in dieser Arbeit angewendeten strategischen Versuchsaufbau zur Identifizierung β -adrenerg regulierter Phosphoproteine. Die Probenvorbereitung beinhaltete neben der Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren den Proteinverdau und die anschließende Anreicherung der phosphorylierten Peptide. Um einen breiten Bereich des gesamten Phosphoproteoms zu erfassen, wurden zwei unterschiedliche Anreicherungsstrategien, IMAC und TiO_2 , verwendet. Zusätzlich wurden Schritte zur Aufreinigung, Konzentration und Reduktion der Probenkomplexität durchgeführt. Die Analyse der angereicherten Phosphopeptide erfolgte massenspektrometrisch mit anschließender Datenbanksuche und manueller Spektrenvalidierung. Basierend auf der LC-MS/MS-Analyse wurden ausgewählte Phosphopeptide in Hinblick auf β -adrenerge Regulation relativ quantifiziert.

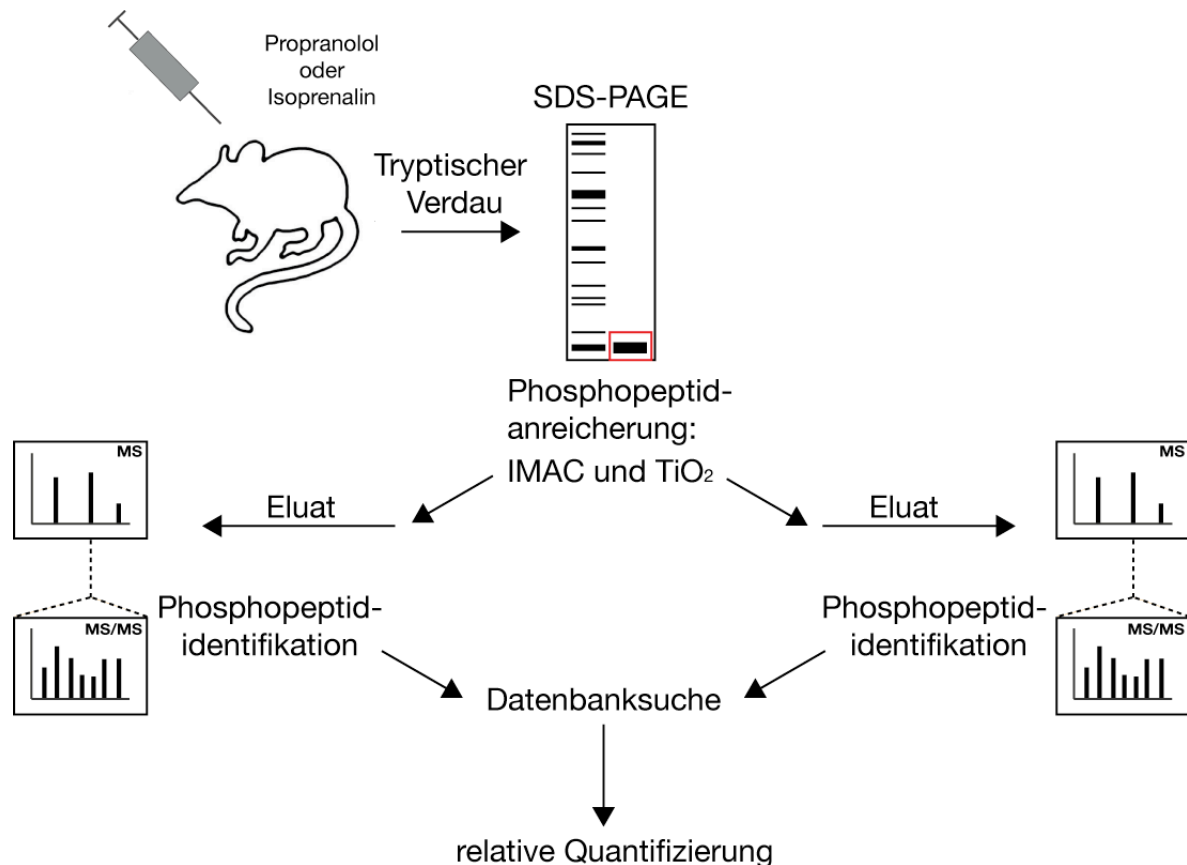


Abbildung 55: Strategischer Ablauf der Probengewinnung, Probenaufarbeitung und der massenspektrometrischen Analyse zur Charakterisierung des kardialen β -adrenergen Phosphoproteoms.

4.1.1 Probengewinnung, proteolytischer Verdau und Aufreinigung

Für die differenzielle Analyse des murinen kardialen Phosphoproteoms wurde in einem initialen Schritt die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren im Mausherz vorgenommen. Als β -AR-aktivierendes Agens wurde Isoprenalin, eine adrenalinähnliche Substanz, gewählt, die im Vergleich zu den endogenen Botenstoffen Adrenalin oder Noradrenalin keine α -adrenerge Affinität besitzt^{105,106}. Um die β -adrenerg-bedingte Phosphorylierung möglichst gering zu halten, wurden als Kontrollgruppe Mäuse verwendet, deren endogene β -adrenerge Rezeptoren mit Propranolol, einem unselektiven β_1/β_2 -Antagonisten, inhibiert worden waren. Die Aktivierung der Rezeptoren fand innerhalb eines zweiminütigen Stimulationszeitraums statt. Nach 2 min zeigte die Echokardiographie ein Maximum der kardialen Kontraktion. Diese Beobachtung stimmte mit vorangegangenen Studien an isolierten Maus-Kardiomyozyten überein, in denen ein Isoprenalin-induziertes Phosphorylierungsmaximum von TnI ebenfalls nach 2 min beschrieben wurde¹⁰⁷.

Die Gewinnung des biologischen Materials stellte einen wichtigen Schritt dar. Um eine hohe Ausbeute an messbaren Peptiden ohne ungewollte Modifikationen oder Proteindegradationen zu erhalten, wurde ein 2% SDS-Lysepuffer ohne Zusatz modifizierender Komponenten verwendet. Zur Vermeidung von Degradation und Dephosphorylierung wurde der Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt.

Nach Trypsinverdau wurden die Proben durch eine C18-Festphasenextraktion aufgereinigt. Diese Reinigungsschritte waren mit einem möglichen Probenverlust verbunden, allerdings konnten dadurch unerwünschte Probenbestandteile wie nicht bindende Salze und stark bindende, nicht eluierende Bestandteile wie Lipide, insbesondere Phospholipide, entfernt werden¹⁰⁸. Durch eine fraktionierte Elution mit steigendem MeCN-Gehalt (15%, 35% und 55%) des Elutionspuffers wurden nicht nur die unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften der Phosphopeptide während der Elution berücksichtigt, sondern auch die Probenkomplexität durch eine zusätzliche Aufteilung weiter verringert.

4.1.2 Phosphopeptid-Anreicherung

Da im Hintergrund aller nicht-phosphorylierten Peptide der Anteil phosphorylierter Peptide für eine direkte Analyse zu gering ist, wurde eine spezifische Anreicherung der Phosphopeptide vor der massenspektrometrischen Analyse durchgeführt. In dieser Arbeit wurden zwei affinitätschromatographiebasierte Anreicherungsmethoden zur Isolation phosphorylierter Peptide aus dem Gesamtverdau benutzt: IMAC und TiO_2 . Während mit IMAC 272 Phosphopeptide identifiziert wurden, lag der Anteil der TiO_2 -isolierten Phosphopeptide mit 349 Peptiden höher (Abb. 18). Neben deutlichen Unterschieden in der Kapazität zeigte die TiO_2 -Anreicherung ein etwas höheres Maß an Spezifität. Der Anteil nicht-phosphorylierter Peptide war nach TiO_2 -Anreicherung etwas geringer, verglichen mit IMAC, was die bereits in der Literatur beschriebene Überlegenheit der TiO_2 -Anreicherung gegenüber IMAC bestätigte^{62,67}.

Die Verhältnisse der Phosphorylierungsstellen aller detektierten Phosphoserine (88,7%) stimmen mit der bereits erwähnten, in der Literatur angegebenen relativen Häufigkeit von 1800:200:1 für Phosphoserin (pSer), Phosphothreonin (pThr) und Phosphotyrosin (pTyr) nur eingeschränkt überein² (Abb. 19). Die detektierten Phosphothreonine sind mit 5,4% unterrepräsentiert. Ein möglicher Grund könnte die unmittelbare Nachbarschaft vieler potentieller Threonin-Phosphorylierungsstellen zu Serinen sein, weshalb eine eindeutige Zuordnung der Phosphorylierungsstelle nicht vorgenommen werden konnte. 0,2% Phosphotyrosine konnten identifiziert werden. Olsen et al. schlagen jedoch eine weitaus höhere Zahl phosphory-

lierter Tyrosine im Phosphoproteom vor und vermuten eine generelle Unterschätzung von Phosphotyrosinresten in Phosphoproteomanalysen³. Prinzipiell können mit *large scale*-Phosphoproteomanalysen keine genauen Angaben über Phosphotyrosine getroffen werden, da die Tyrosin-Phosphorylierung oft an niedrig abundanten Proteinen erfolgt, was eine Detektion erschwert. Hinzu kommt, dass die Phosphorylierung an Tyrosin möglicherweise weniger stabil ist, verglichen mit der von Serin oder Threonin³.

Die momentan bekannten Verfahren zur Anreicherung phosphorylierter Peptide isolieren alle jeweils nur ein bestimmtes, teilweise überlappendes Segment des gesamten Phosphoproteoms¹⁰⁹. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Anreicherungsstrategien konnten lediglich 191 der 430 identifizierten Phosphopeptide von beiden Verfahren identifiziert werden. Um eine möglichst breite Abdeckung des gesamten Phosphoproteoms zu erreichen und die Nachteile der jeweiligen Anreicherungsstrategie zu kompensieren, ist somit eine Kombination von mindestens zwei Anreicherungsverfahren zur Abdeckung eines möglichst breiten Bereichs des Phosphoproteoms zu empfehlen.

4.1.3 Datenanalyse und Spektreninterpretation

Die isolierten Phosphopeptide wurden mittels nano-LC-MS/MS analysiert. Die Phosphopeptididentifikationen der MS/MS-Messungen wurden mit dem Mascot Suchalgorithmus (Matrix Science, London, GB) gegen die Swiss-Prot Datenbank gesucht und nachfolgend einer zusätzlichen manuellen Validierung unterzogen.

Diese manuelle Validierung ist notwendig, da gerade im Bereich der Analyse variabler Modifikationen die genaue Zuordnung des modifizierten Aminosäurerestes ein Problem darstellt. Meist kann in Peptiden, die mehrere Serine oder Threonine in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander enthalten, die genaue Position der Modifikation nicht eindeutig zugeordnet werden. Der Mascot-Algorithmus gibt allerdings immer eine exakte Position der Phosphorylierung an, oftmals basierend auf Signalen, die nicht definitiv vom Rauschen zu unterscheiden oder teilweise gar nicht vorhanden sind. Abbildung 56 zeigt die möglichen Fragmentationen des Peptids RGSSEEDMYLDTPTSASR der Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A, in rot dargestellt die detektierten Fragmentationen. Das Spektrum besitzt einen Score von 49, deutlich oberhalb des Mascot-Schwellenwertes. Die rot markierten Fragmentationen treten gerade im hinteren Bereich des Peptides als klar erkennbare durchgehende y-Ionenserie auf, die im MS/MS-Spektrum als eindeutige Signale vom Rauschen unterschieden werden können. Der Mascot-Suchalgorithmus gibt als Position für die Phosphorylierung Serin Nummer 6 an, welches in einem Bereich des Peptids liegt, der kaum durch spezifische Fragmentationen abgedeckt ist und zudem zwei weitere Serine (S3, S5) in enger Nachbar-

schaft enthält. Obwohl es sich bei diesem Phosphopeptid sehr wahrscheinlich um eine richtig positive Identifikation handelt, kann die eindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure nicht erfolgen.

#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ^{*++}	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ^{*++}	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	157.1084	79.0578	140.0818	70.5446			R							19
2	214.1299	107.5686	197.1033	99.0553			G	1842.7810	921.8942	1825.7545	913.3809	1824.7705	912.8889	18
3	301.1619	151.0846	284.1353	142.5713	283.1513	142.0793	S	1785.7596	893.3834	1768.7330	884.8702	1767.7490	884.3781	17
4	358.1833	179.5953	341.1568	171.0820	340.1728	170.5900	G	1698.7275	849.8674	1681.7010	841.3541	1680.7170	840.8621	16
5	445.2154	223.1113	428.1888	214.5980	427.2048	214.1060	S	1641.7061	821.3567	1624.6795	812.8434	1623.6955	812.3514	15
6	514.2368	257.6221	497.2103	249.1088	496.2263	248.6168	S	1554.6741	777.8407	1537.6475	769.3274	1536.6635	768.8354	14
7	643.2794	322.1433	626.2529	313.6301	625.2689	313.1381	E	1485.6526	743.3299	1468.6261	734.8167	1467.6420	734.3247	13
8	758.3064	379.6568	741.2798	371.1435	740.2958	370.6515	D	1356.6100	678.8086	1339.5835	670.2954	1338.5994	669.8034	12
9	889.3468	445.1771	872.3203	436.6638	871.3363	436.1718	M	1241.5831	621.2952	1224.5565	612.7819	1223.5725	612.2899	11
10	1052.4102	526.7087	1035.3836	518.1955	1034.3996	517.7034	Y	1110.5426	555.7749	1093.5160	547.2617	1092.5320	546.7696	10
11	1165.4942	583.2508	1148.4677	574.7375	1147.4837	574.2455	L	947.4793	474.2433	930.4527	465.7300	929.4687	465.2380	9
12	1280.5212	640.7642	1263.4946	632.2510	1262.5106	631.7589	D	834.3952	417.7012	817.3686	409.1880	816.3846	408.6959	8
13	1381.5689	691.2881	1364.5423	682.7748	1363.5583	682.2828	T	719.3682	360.1878	702.3417	351.6745	701.3577	351.1825	7
14	1478.6216	739.8145	1461.5951	731.3012	1460.6111	730.8092	P	618.3206	309.6639	601.2940	301.1506	600.3100	300.6586	6
15	1579.6693	790.3383	1562.6428	781.8250	1561.6587	781.3330	T	521.2678	261.1375	504.2413	252.6243	503.2572	252.1323	5
16	1666.7013	833.8543	1649.6748	825.3410	1648.6908	824.8490	S	420.2201	210.6137	403.1936	202.1004	402.2096	201.6084	4
17	1737.7384	869.3729	1720.7119	860.8596	1719.7279	860.3676	A	333.1881	167.0977	316.1615	158.5844	315.1775	158.0924	3
18	1824.7705	912.8889	1807.7439	904.3756	1806.7599	903.8836	S	262.1510	131.5791	245.1244	123.0659	244.1404	122.5738	2
19							R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1

Abbildung 56: Liste der Fragmentationen des Phosphopeptids RSGSSEDMYLDTPTSASR der Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A. In rot sind die identifizierten Fragmentationen dargestellt.

Manchmal kann ein Phosphopeptid nicht eindeutig nur einem Protein zugeordnet werden, da innerhalb einer Proteinfamilie ein hoher Grad an Homologie vorliegt oder verschiedene Isoformen eines Proteins existieren. Dies stellt ein weiteres Problem des Mascot-Suchalgorithmus dar, da eindeutige Peptididentifikationen eines Proteins gemeinsam mit nicht-eindeutigen Treffern präsentiert werden. Um nicht-eindeutige Peptid-Protein-Annotationen zu vermeiden, wurden alle identifizierten Phosphopeptide mit Hilfe des „MS-Homology Tools“ des Programms ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) auf mehrfach mögliche Zuordnung überprüft. Obwohl diese mehrfachen Peptidzuordnungen nicht in die finale Auswertung aufgenommen wurden, bedeutet dies nicht, dass sie falsch sind. Zum Beispiel kann die gleiche Phosphorylierungsstelle in mehreren Protein-Isoformen auftreten. Tabelle 10.3.1 enthält die Phosphopeptide, welche ausschließlich in β -adrenerg stimuliertem Gewebe identifiziert wurden, allerdings aufgrund nicht eindeutiger Zugehörigkeit aus der finalen Auswertung ausgeschlossen wurden. Darunter befindet sich auch Serin 302 des MyBP-C, welches bereits als PKA-regulierte Phosphorylierungsstelle bekannt ist¹¹⁰.

4.1.4 Das β -adrenerge Phosphoproteom

In der LC-MS/MS-Messung konnten nach manueller Validierung insgesamt 430 Phosphopeptide identifiziert werden (10.4). 88 dieser 430 Phosphopeptide wurden nur in β -adrenerg stimuliertem Gewebe nachgewiesen (Tabelle 3.1.4.1).

Chu et al. führten 2004 ebenfalls eine Analyse des Phosphoproteoms muriner Kardiomyozyten nach Isoprenalin-Stimulation durch. Diese Analyse beruhte auf einer 2-D Gelelektrophorese in Kombination mit einer [^{32}P] Autoradiographie, was zum Nachweis einer weitaus kleineren Menge phosphorylierter Peptide führte, deren Zugehörigkeit größtenteils auf sehr abundante Phosphoproteine beschränkt war. Proteine mit hoher Hydrophobizität oder extremen isoelektrischen Punkten konnten in der 2-D-Gelelektrophorese nicht aufgetrennt und daher nicht analysiert werden¹⁰⁴. Der von uns verwendete Versuchsaufbau erlaubte zudem die Detektion niedrig abundanter β -adrenerger Zielproteine. Im Gegensatz zu Chu et al., die in ihrem Versuchsansatz nur phosphoryliertes TnI aus den unter 1.2.3 beschriebenen Beispielen bekannter kardialer PKA-Substrate detektierten, wurde in dieser Arbeit neben phosphoryliertem TnI zusätzlich Phosphopeptide des PLN, des MyBP-C und des Cav1.2 identifiziert.

Dem kardialen TnI konnten zwei differenziell regulierte Phosphopeptide zugeordnet werden. Serin 24 des humanen TnI ist bereits als PKA-Phosphorylierungsstelle beschrieben und wird unter anderem für die reduzierte Ca^{2+} -Sensitivität des Sarkomers nach TnI-Phosphorylierung verantwortlich gemacht¹¹¹. Obwohl diese Phosphorylierungsstelle ein gut untersuchtes Beispiel PKA-vermittelter Proteinregulation ist, musste dieses richtig-positive Spektrum gemäß der Kriterien der manuellen Validierung aufgrund eines zu geringen Scores verworfen werden. Serin 167 des murinen TnI wurde bereits an äquivalenter Position im humanen TnI nach *in vitro* Phosphorylierung mit PKA beschrieben¹¹². Obwohl es sich bei der Peptidsequenz AKEpSL um keine definierte PKA-Konsensussequenz handelt, konnte pS167 von uns nur unter β -adrenerger Stimulation nachgewiesen werden. Eventuell werden durch die Proteinfaltung andere basische Reste in die unmittelbare Nachbarschaft dieser Phosphorylierungsstelle gebracht, was eine Phosphorylierung durch PKA ermöglicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten auch Serin 16, die PKA-vermittelte Phosphorylierungsstelle des PLN, sowie Threonin 17, eine CaMKII (Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II)-abhängige Phosphorylierungsstelle detektiert werden^{113,114}. Bisher sind beide Phosphorylierungsstellen im murinen PLN lediglich unter „*by similarity*“ in der Swiss-Prot Datenbank aufgelistet. Im kardialen MyBP-C wurden neben der bekannten, PKA-regulierten Phosphorylierungsstelle Serin 273 noch zwei weitere, bisher nicht in der Swiss-Prot Daten-

bank annotierte Phosphorylierungsstellen (S72, S307) gefunden. Das ebenfalls bekannte PKA-regulierte Serin an Position 302 des MyBP-C wurde aufgrund mehrfach möglicher Peptid-Protein-Annotation von der Auswertung ausgeschlossen¹¹⁰ (Tabelle 10.3.1). Die in der Swiss-Prot Datenbank aufgelisteten PKA-Phosphorylierungsstellen des Cav1.2 konnten in dieser Arbeit nicht detektiert werden, jedoch Serin 1670, eine weitere, bereits beschriebene Phosphorylierungsstelle des Cav1.2. Es wird vermutet, dass Serin 1670 (RRAlpS) ebenfalls durch PKA phosphoryliert wird^{115,116}.

Überraschenderweise konnten das PKA-regulierte Serin 16 des PLN, Serin 273 des MyBP-C und Serin 1670 des Cav1.2 neben Isoprenalin-stimuliertem kardialen Gewebe auch in der Kontrollgruppe detektiert werden. PKA-regulierte Phosphorylierungsstellen hoch-abundanter Proteine oder hoch-phosphorylierter PKA-Zielproteine liegen wahrscheinlich auch nach fünfstündiger Propranolol-Behandlung teilweise noch in phosphorylierter Form vor und können in detektierbarem Maße isoliert werden. In gleicher Weise kann dies für Phosphorylierungsstellen der Fall sein, die keiner kurzfristigen Regulation unterliegen und trotz vorangegangener Propranolol-Behandlung noch nicht ausreichend dephosphoryliert wurden. Des Weiteren ist bei der Phosphorylierung von Proteinen zu beachten, dass viele Kinasen, gerade im Bereich der basophilen Kinasen, überlappende Konsensussequenzen besitzen und daher oft ein Aminosäurerest von mehr als einer Kinase phosphoryliert werden kann⁷. Serin 273 des MyBP-C wird beispielsweise neben PKA auch von PKC phosphoryliert, was einen möglichen Grund für die nicht ausschließlich unter Isoprenalin stattgefundene Detektion darstellt¹¹⁰. Unabhängig einer β -adrenergen Regulation enthalten die Phosphopeptide der diskutierten PKA-Substrate teilweise bislang unbekannte Phosphorylierungsstellen, welche im Hinblick auf die wichtigen funktionellen Rollen dieser Proteine im Myokard weitere Erkenntnisse zur Regulation dieser Proteine beisteuern können.

Erfolgt kein Nachweis von bekannten und erwarteten Phosphopeptiden kann dies verschiedene Ursachen haben: (1) Das jeweilige Phosphopeptid liegt in zu geringer Konzentration vorliegen, weshalb keine effiziente Anreicherung möglich ist. (2) Erzeugt der proteolytische Verdau keine Peptide geeigneter Länge, kann die jeweilige Phosphorylierungsstelle ebenfalls nicht detektiert werden, da zu kurze oder zu lange Peptide für die LC-MS/MS-Messung mit CID nicht geeignet sind. Eine entscheidende Rolle spielt außerdem die Qualität der Spektren; (3) genügen die Spektren nicht den gesetzten Kriterien, können sie nicht von dem verwendeten Suchalgorithmus identifiziert werden und erscheinen folglich nicht im Identifikationsreport.

Prinzipiell können in einem direkten Vergleich von MS/MS-Daten unterschiedlich behandelte biologischer Proben stark regulierte Phosphorylierungsstellen als stimulationsabhängig identifiziert werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass neben den diskutierten PKA-Substraten noch weitere PKA-regulierte Aminosäurereste in beiden Proben detektiert wurden. Gerade für optimale PKA-Konsensussequenzen bietet sich zur weiteren Validierung der Ergebnisse eine massenspektrometrische relative Quantifizierung der jeweiligen Phosphorylierungsstelle an.

4.1.5 Differenzielle Analyse ausgewählter Phosphorylierungsstellen

Um aus den 88 nur in Isoprenalin-stimuliertem Gewebe nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen ausgewählte Phosphopeptide weiter auf eine β -adrenerge Regulation hin zu untersuchen, wurde eine relative Quantifizierung mittels MRM durchgeführt. Diese Methode erlaubt einen sehr sensitiven Nachweis des jeweiligen Peptids, da durch zuvor definierte Übergänge der restliche Peptidhintergrund ignoriert wird⁷⁹.

Es wurden acht Phosphopeptide aus sieben verschiedenen Proteinen ausgewählt (Tabelle 3.1.5.1). Die Analyse der relativen Verhältnisse dieser Phosphopeptide bestätigte vier Phosphopeptide als stark β -adrenerg reguliert (Q9DC77, Small muscular protein, vermutlich S36; Q8BG95, Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B, S420; Q9JJW5, Myozenin-2, S37; Q6IR34, G protein signaling modulator 1, S567). Bei den Phosphopeptiden handelt es sich um vier PKA-Konsensussequenzen (S36 im Fall des Small muscular protein). Eine Tendenz zu erhöhter Phosphorylierung unter β -adrenerger Stimulation zeigte die bereits bekannte Phosphorylierungsstelle aus dem Bcl-2-like 13 protein, allerdings konnten die gewählten Übergänge nur in Messung 1 detektiert werden. Die analysierte Phosphorylierungsstelle des Juncctophilin-2 konnte als Monophosphopeptid schwach differenziell phosphoryliert nachgewiesen werden, während die Phosphorylierung des Synaptopodins gar nicht reguliert war. Dies war überraschend, da dieses Phosphopeptid sowohl in der IMAC- als auch in der TiO_2 -Anreicherung ausschließlich in den Isoprenalin-stimulierten Proben gefunden wurde. Bei diesem phosphorylierten Aminosäurerest handelte es sich um keine PKA-Konsensussequenz (Abb. 24).

Alle ausgewählten Phosphopeptide konnten in der MRM-Messung als richtig positive Phosphopeptide verifiziert werden. Eine relative Quantifizierung der MRM-Messung ist allerdings nur möglich, wenn eine detektierbare Grundphosphorylierung auch unter Kontrollbedingungen/Rezeptorblockade herrscht. Es ist somit davon auszugehen, dass alle analysierten Phosphopeptide auch unter Rezeptorblockade detektierbar phosphoryliert vorliegen. Im

Fall der vier stark regulierten Phosphopeptide konnte durch die Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren eine erhebliche Steigerung der Phosphorylierung erreicht werden, was eine β -adrenerge Regulation weiter bekräftigte. Diese starke differenzielle Phosphorylierung konnte im Zuge der MRM-Messungen für vier der fünf untersuchten PKA-Konsensussequenzen bestätigt werden. Deshalb stellen gerade die PKA-Substrate unter den 88 zum Teil neuen, nur in stimuliertem Gewebe detektierten Phosphorylierungsstellen wichtige Ausgangspunkte für eine weitere funktionelle Analyse β -adrenerg vermittelter Signaltransduktion dar.

4.2 Charakterisierung der Phosphorylierungsstelle Serin 37 des MYOZ2

Mit Serin 37 des MYOZ2 konnte eine bislang unbekannte β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstelle im MYOZ2 identifiziert werden. MYOZ2 gehört neben Myozenin-1 (MYOZ1, Calsarcin 2) und Myozenin-3 (MYOZ3, Calsarcin 3) zu der muskelspezifischen Myozenin-Proteinfamilie und ist die herzmuskelspezifische Isoform dieser Proteinfamilie⁸⁹. Vergleicht man die Proteinsequenzen von MYOZ2 und den weiteren Familienmitgliedern, finden sich vor allem im N- und C-terminalen Teil hohe Homologien, welche in der Sekundärstrukturvorhersage als mögliche α -helikale Domänen vorgeschlagen werden¹¹⁷. Serin 37 des MYOZ2 liegt innerhalb einer Region höchster Homologie, wobei die Konservierung dieser Position nicht nur innerhalb der murinen Myozenin-Proteinfamilie erhalten ist, sondern sich spezieübergreifend fortsetzt (Abb. 57). Diese ausgeprägte Homologie der Aminosäuresequenz und die β -adrenerge Regulation des zentral gelegenen Serin 37 lassen eine wichtige funktionelle oder strukturelle Rolle dieses Proteinabschnittes vermuten, welche bisher jedoch noch nicht bestätigt werden konnte. Die Myozenin-Familie zeigt ansonsten keinerlei Homologie zu anderen Proteinen, weshalb über einen Datenbank-Sequenzvergleich keine Informationen aufgrund struktureller Ähnlichkeiten erhalten werden können.

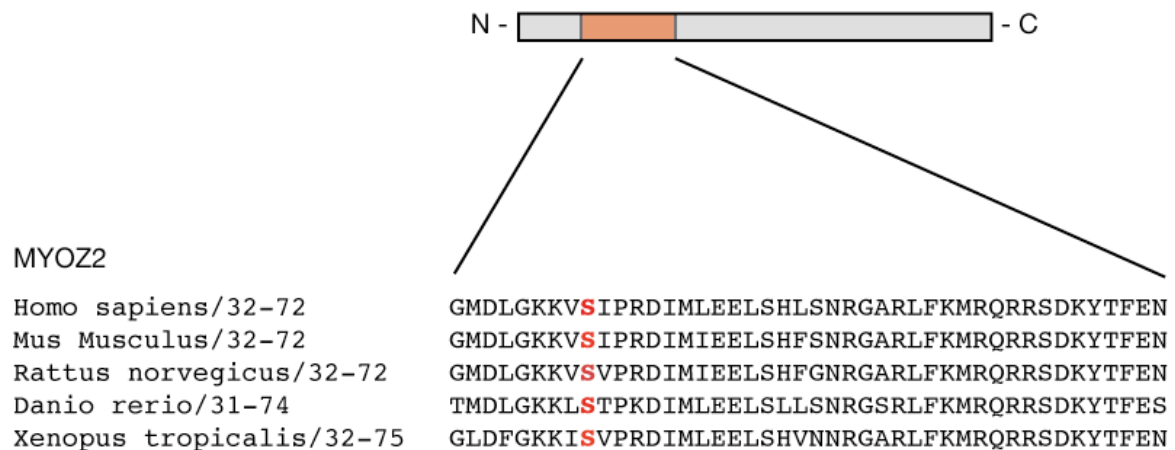


Abbildung 57: Alignment eines Aminosäureabschnittes der MYOZ2-Sequenz ausgewählter Spezies. In rot ist das in dieser Arbeit identifizierte, β -adrenerg regulierte Serin dargestellt.

4.2.1 Analyse der nukleären Lokalisation des MYOZ2

In der Immunofluoreszenz zeigte das endogene MYOZ2 neben der Lokalisation an der Z-Scheibe von NRCM eine klare, bis dahin unbekannte nukleäre Lokalisation (Abb. 28). Die meisten Z-Scheiben-Proteine erfüllen eine strukturelle Rolle im Aufbau der Z-Scheibe oder erhalten die Z-Scheibenintegrität während der Muskelkontraktion. Es wird jedoch immer deutlicher, dass die Z-Scheibe neben der strukturellen Funktion auch einen wichtigen Ankerpunkt für Signalproteine wie beispielsweise Kinasen (z.B. PKA) oder Phosphatasen (z.B. Calcineurin) darstellt¹¹⁸. Für mehrere an der Z-Scheibe lokalisierte Proteine ist bereits eine Translokation von der Z-Scheibe zum Nukleus beschrieben, unter anderem für Calcineurin, einem direkten Interaktionspartner des MYOZ2¹¹⁹. Diese ähnliche Translokation des Calcineurins und des MYOZ2 zwischen den beiden zellulären Kompartimenten könnte ein Hinweis auf eine gemeinsame aktive Beteiligung in der intrazellulären Signaltransduktion sein.

Der pS37-MYOZ2-Antikörper zeigte neben einer Z-Scheibenlokalisierung des MYOZ2 ein dominantes Signal des S37-phosphorylierten MYOZ2 im Zellkern (Abb. 30). Weder Propranolol- noch Isoprenalin-Stimulation waren in der Lage, eine Veränderung der zellulären Lokalisation des MYOZ2 zu bewirken. Ebenso konnten alle YFP-Mutanten des MYOZ2 im Zellkern von NRCM detektiert werden (Abb. 31). Die Frage, ob Serin 37 an der Modulation der MYOZ2-Lokalisation beteiligt ist, kann trotz der hohen Signalintensität des pS37-MYOZ2 im Zellkern bis jetzt nicht beantwortet werden. Da außerdem weder ein potentiell nukleäres Lokalisationssignal noch eine konservierte nukleäre Exportsequenz im MYOZ2 vorhergesagt werden kann, bleiben die den Transport regulierenden Faktoren, sowie die

Funktion des MYOZ2 im Zellkern weiter zu klären. Parallel zu den Befunden in dieser Arbeit konnten auch Paulsson et al. eine nukleäre Lokalisation des MYOZ2 nachweisen, ließen aber auch Funktion und Regulation der Kernlokalisation des MYOZ2 offen⁸⁷.

4.2.2 Analyse der Interaktion von MYOZ2 und dessen Bindungspartnern in Abhängigkeit von Serin 37

Trotz einer relativ geringen Größe von 34 kDA und einer globulären Konformation sind mehrere Interaktionspartner des MYOZ2 bekannt. Zusätzlich zu α -Aktinin ist eine Interaktion des MYOZ2 mit Calcineurin, TCAP, FLNC und LDB3 beschrieben^{89-91,117}. Die jeweiligen Proteininteraktionen dürften bestimmten Regulationsmechanismen unterliegen und möglicherweise kompetitiv sein, da eine gleichzeitige Bindung der fünf Proteine bei teilweise überlappenden Binderegionen an MYOZ2 unwahrscheinlich ist. Die Binderegion von α -Aktinin und Calcineurin wurden am C-Terminus des MYOZ2 identifiziert⁸⁹. In einer weiteren Studie konnte eine zusätzliche Bindung beider Proteine an den N-Terminus des MYOZ2 beobachtet werden⁹⁰. Für LDB3 wird eine C-terminale Region des MYOZ2 als Binderegion angegeben, welche eventuell durch PKA-Phosphorylierung moduliert wird⁹¹. Die Binderegionen des TCAP und FLNC sind für MYOZ2 nicht bekannt. Keine der bekannten Binderegionen beinhaltet Aminosäure Serin 37, allerdings liegen gerade die N-terminalen Binderegionen in enger Nachbarschaft zu Serin 37. Da die Modifikation eines Aminosäurerestes unter anderem die Konformation eines Proteins ändern kann¹²⁰, ist trotz der Lokalisation von Serin 37 außerhalb der angegebenen Binderegionen eine Beteiligung an der Proteininteraktion möglich.

Um den Einfluss von Serin 37 auf die α -Aktinin-MYOZ2-Interaktion zu untersuchen, wurden zur Unterscheidung der exogen eingeführten MYOZ2-Proteine von endogenem MYOZ2 C-terminale YFP-Fusionsproteine gewählt. Alle MYOZ2 YFP-Proteine lokalisierten unabhängig der Aminosäure an Position 37 primär an der Z-Scheibe von NRCM und wiesen in einer Co-Färbung mit endogenem α -Aktinin eine deutliche Überlappung der Lokalisation auf (Abb. 31). Diese Co-Lokalisation lässt keine ausgeprägte S37-abhängige Interaktion vermuten. Eine Modulation der Bindeaffinität durch S37-Phosphorylierung kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da eine quantitative Aussage der Z-Scheibenlokalisation der einzelnen MYOZ2-Konstrukte anhand der Immunfluoreszenz nicht getroffen werden konnte.

Zur Untersuchung der S37-abhängigen Interaktion von MYOZ2 und den anderen Bindungspartnern Calcineurin, TCAP, FLNC und LDB3 wurden CoIP-Experimente durchgeführt. Die äußerst schwache Interaktion aller Bindungspartner und MYOZ2 erwies sich bereits in HEK 293-Vorversuchen als problematisch und erlaubte keine zuverlässige Aussage der Interakti-

on bezüglich Serin 37. Für die weiteren Versuche wurde ein *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem gewählt. Dieses System erfordert keinen Zellaufschluss und erlaubt daher eine sehr niedrige Detergentkonzentration im Bindepuffer von 0,01%. Während die IP der jeweiligen Proteine nachweisbar erfolgte, konnte auch im zellfreien System keine quantitativ auswertbare Interaktion detektiert werden. Die jeweiligen Mutanten (S37A, S37D) zeigten ebenso wie MYOZ2 S37 eine vergleichbar geringe Affinität zu den jeweiligen Bindungspartnern (Abb. 33-35). Fehlende zelluläre Strukturen oder posttranslationale Modifikationen könnten eine mögliche Erklärung für die schwache Interaktion darstellen, da ebenso wie MYOZ2 die Bindungspartner FLNC (S2234), TCAP (S161), LDB3 (S98, T119, S123, S179) und α -Aktinin-2 (T237) als kardiale Phosphoproteine in dieser Arbeit nachgewiesen wurden. Dieses komplexe Phosphorylierungsmuster von MYOZ2 und seinen Interaktionspartnern lässt eine durch Phosphorylierung modulierte Interaktion vermuten, welche allerdings in dem verwendeten System schwer zu erfassen ist. Nutzt man Kardiomyozyten als zellulären Hintergrund der Interaktionsanalyse, ist zwar der endogene Kontext vorhanden, mit diesem jedoch auch das endogene MYOZ2. Prinzipiell ist eine Interaktionsanalyse mittels CoIP mit vorangehender differenzieller Stimulation in Erwägung zu ziehen. Ohne Überexpression der Bindungspartner ist dies jedoch durch die jeweiligen endogenen Proteinkonzentrationen limitiert.

Ein gut charakterisierter Interaktionspartner des MYOZ2 ist die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin, die im Herzmuskel in die Entwicklung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz involviert ist. Mäuse, die eine konstitutiv aktive Form dieser Phosphatase im Herzen überexprimierten, entwickelten einen massiv hypertrophen Phänotyp bis hin zur Kardiomyopathie¹²¹. Schaltet man die MYOZ2-Expression im Hintergrund einer kardialen Calcineurin-Überexpression aus, wird der bereits hypertrophe kardiale Phänotyp der Calcineurin-transgenen Mäuse noch weiter verstärkt⁹³. MYOZ2 reguliert die Aktivität dieser Phosphatase negativ. Obwohl nur eine sehr schwache Interaktion von Calcineurin und MYOZ2 in den CoIP-Experimenten nachgewiesen werden konnte, war eine negative Regulation der Calcineurin-Aktivität durch MYOZ2 in NRCM zu beobachten (Abb. 36). Diese Inhibition der Calcineurin-Aktivität zeigte allerdings keine messbaren S37-phosphorylierungsbedingten Unterschiede. Der endogene MYOZ2-Hintergrund kann in NRCM zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse geführt haben. Die ebenfalls untersuchten HEK 293-Zellen lieferten allerdings keine reproduzierbaren Messergebnisse. Prinzipiell gibt es keine Anhaltspunkte zur Annahme einer Abhängigkeit der Calcineurin-Aktivität von der Phosphorylierung an Serin 37. Ob Calcineurin als Phosphatase für Serin 37 in Frage kommt oder Serin 37 in Kombination mit weiteren Phosphorylierungsstellen des MYOZ2 zur Regula-

tion der Calcineurin-Aktivität beiträgt, ist noch zu klären. Die Funktion von Serin 37 des MYOZ2 bleibt im Moment unklar. Generell wäre für weitere Untersuchungen der Phosphorylierungsstelle Serin 37 des MYOZ2 ein endogener, MYOZ2-freier Hintergrund die beste Basis der Analyse. In optimaler Weise wäre dieser in einem S37-Knock-in Modell verwirklicht.

4.3 Funktionelle Charakterisierung von Serin 567 des GPSM1

Neben Serin 37 des MYOZ2 konnte des Weiteren Serin 567 des G protein signaling modulator 1 (GPSM1) in dieser Arbeit als eine neue β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. GPSM1 gehört neben GPSM2, GPSM3 und RGS12 zur Gruppe II der sogenannten Aktivatoren der G-Protein Signaltransduktion (AGS). Alle Gruppe II-Mitglieder besitzen als gemeinsames strukturelles Merkmal mindestens ein Goloco (*Goloco motif*, *G protein regulatory motif*)-Motiv⁹⁵. Dieses 20-25 Aminosäuren-lange Sequenzmotiv bindet spezifisch $G\alpha_i$, $G\alpha_t$ und in geringerem Ausmaß $G\alpha_o$ in ihrem inaktiven, GDP-gebundenem Zustand⁹⁵. Alle Goloco-Motive besitzen neben schwach konservierten Aminosäureabfolgen am Anfang und Ende des Motivs eine hoch konservierte Abfolge aus drei Aminosäuren (D-Q-R, in Ausnahmefällen E-Q-R). Diese Aminosäure-Triade ist nicht nur an der Bindung der $G\alpha$ -Untereinheit beteiligt, sondern zudem für die GDI (*Guanine nucleotide dissociation inhibitor*)-Aktivität dieses Motivs verantwortlich^{100,122,123}. Der Goloco- $G\alpha_i/t/o$ -GDP-Komplex ist frei von $G\beta\gamma$, weshalb die Assoziation des Goloco- $G\alpha_i/t/o$ -GDP-Komplexes zu einer rezeptorunabhängigen Verstärkung der $G\beta\gamma$ -Signaltransduktion führt¹⁰² (Abb. 58).

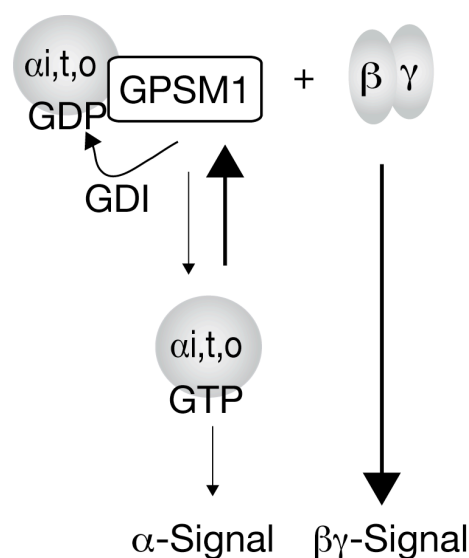


Abbildung 58: Einfluss von GPSM1 auf die $G\alpha G\beta\gamma$ -Signaltransduktion. GPSM1 bindet über ein Goloco-Motiv die $G\alpha$ -GDP-Untereinheit und stabilisiert durch die GDI (*Guanine nucleotide dissociation inhibitor*)-Aktivität des Goloco-Motivs die inaktive, GDP-gebundene Form von $G\alpha$. Die Bindung des Goloco-Motivs an $G\alpha$ verhindert die Assoziation von $G\alpha$ mit der $G\beta\gamma$ -Untereinheit und führt dadurch zu einem verstärkten, Rezeptor-unabhängigen $G\beta\gamma$ -Signal.

Das β -adrenerg regulierte Serin 567 befindet sich am Ende des 2. (Aminosäure 546 bis 568) von vier Goloco-Motiven, in unmittelbarer Nähe der hochkonservierten Aminosäure-Triade D/E-Q-R. Serin 567 ist organismusübergreifend neben dem murinen GPSM1 auch im humanen und Ratten-GPSM1-Protein konserviert. Vergleicht man das 2. Goloco-Motiv des GPSM1 mit dem 2. Goloco-Motiv des GPSM2 (Q8VDU0), einem weiteren Familienmitglied der Gruppe II der Aktivatoren der G-Protein Signaltransduktion, zeigen beide Goloco-Motive ein hohes Maß an Homologie, unter anderem an Position 567 (Abb. 59). Serin 564, die Serin 567-äquivalente Position des GPSM2, ist bereits als phosphorylierte Aminosäure im murinen GPSM2 beschrieben¹²⁴. GPSM1 und GPSM2 besitzen die identische Domänenstruktur und eine 59-prozentige Aminosäureidentität¹²⁵. Die gleiche Kinase und ein möglicher gemeinsamer funktioneller Hintergrund dieser Phosphorylierungsstelle dürften sehr wahrscheinlich sein, jedoch sind für Serin 564 des GPSM2 bislang keine weiteren Informationen verfügbar.

```

GPSM1  TEEFFDLIASSQSRRLDDQRASV
GPSM2  TDEFLDLLASSQSRRLDDQRASF
      * : ** : ** : ***** :

```

Abbildung 59: Alignment des 2. Goloco-Motivs des murinen GPSM1 und des murinen GPSM2 (Q8VDU0). Das Motiv ist in beiden Proteinen hochkonserviert, (*) kennzeichnet vollständig konservierte Aminosäuren. (:) repräsentiert die Konservierung starker Gruppen, rot markiert ist das hochkonservierte Serin 567 des GPSM1 und Serin 564 des GPSM2.

In der *in vitro* Phosphorylierung von NRCM nach Forskolin-Stimulation konnte eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung von GPSM1 S567 erzielt werden (Abb. 38). Die S567A-Mutante zeigte keine Signalverstärkung nach Forskolin-induzierter PKA-Aktivierung, was dafür spricht, dass Serin 567 die einzige PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle in der kurzen Isoform des GPSM1 ist. Unter basalen Bedingungen konnten für beide GPSM1-Konstrukte, unabhängig von Serin oder Alanin an Position 567, in der Autoradiographie zwei Proteinbanden beobachtet werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Proteinbanden auf unterschiedliche Phosphorylierungszustände des GPSM1 zurückzuführen sind. Dies deutet darauf hin, dass neben Serin 567 mehr als eine weitere, allerdings nicht PKA-regulierte Phosphorylierungsstelle in der kurzen Isoform des GPSM1 vorhanden ist.

LKB1, eine Serin/Threonin Kinase, bindet die lange Isoform des GPSM1 in der Linkerregion zwischen TPR- und Goloco-Domänen. Immunopräzipitiertes LKB1 war in der Lage, rekombinantes GPSM1 im Bereich der Goloco-Domäne zu phosphorylieren¹²⁶ (Abb. 60). Die exak-

te Position der Phosphorylierung ist bislang unbekannt. Wahrscheinlich ist eine potentielle Phosphorylierungsstelle innerhalb eines der Goloco-Motive, da die Phosphorylierung durch ein Goloco-Konsensuspeptid blockierbar war¹²⁶.

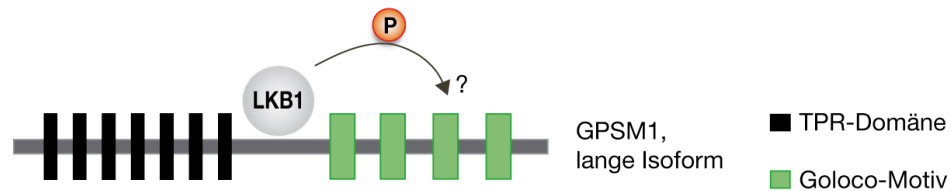


Abbildung 60: Schematische Darstellung der LKB1-Bindung an die Linkerregion der langen Isoform des GPSM1. LKB1 phosphoryliert GPSM1 möglicherweise in der Goloco-Domänenregion, wobei eine exakte Position nicht bekannt ist.

Obgleich die LKB1-Binderegion nicht in der kurzen GPSM1-Isoform enthalten ist, kann eine Phosphorylierung der kurzen überexprimierten Isoform durch LKB1 nicht ausgeschlossen werden. LKB1, selbst ein Substrat der PKA¹²⁷, kann prinzipiell als Kinase für Serin 567 in Betracht gezogen werden, da eine potentielle Konsensussequenz von LKB1 bisher nur sehr unzureichend bestimmt worden ist¹²⁸. Jedoch handelt es sich bei Serin 567 (RASPVG) um eine PKA-Konsensussequenz, was eine direkte Phosphorylierung von Serin 567 durch PKA wahrscheinlicher macht.

4.3.1 Analyse der Goloco-G α i-Interaktion im Hinblick auf die Phosphorylierung an Serin 567

In vielen Proteinen, die ein Goloco-Motiv als gemeinsame strukturelle Domäne teilen, ist eine Phosphorylierung als Regulationsmechanismus der Goloco-G α i-Bindung verbreitet. Hollinger et al. konnten eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von RGS14 in direkter Nähe des RGS14-Goloco-Motivs nachweisen. Die Phosphorylierungsimitation dieser Position führte zu einer dreifach erhöhten GDI-Aktivität des RGS14 gegenüber G α i¹²⁹. Blumer et al. zeigten eine phosphorylierungsvermittelte Modulation der Goloco-G α i-Interaktion durch die bereits erwähnte LKB1-Phosphorylierung von GPSM1, allerdings ist eine tatsächliche *in vivo* Relevanz noch zu klären¹²⁶.

Da das in dieser Arbeit identifizierte β -adrenerg regulierte Serin 567 ein direkter Bestandteil des 2. Goloco-Motivs des GPSM1 ist, wurde der Einfluss der Phosphorylierung an Position 567 auf die GPSM1-G α i-Interaktion untersucht. Dazu wurde ein FRET-basierter Versuchsaufbau gewählt. Kimple et al. benutzten bereits in einem Fluoreszenz-Polarisationsassay ein Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Goloco-Motiv¹³⁰, allerdings zur

Untersuchung potentieller Goloco- $G\alpha i$ -Inhibitoren. Eine Analyse der Goloco- $G\alpha i$ -Interaktion bezüglich struktureller Modifikationen erfolgte dabei nicht. Der in dieser Arbeit verwendete FRET-basierte Versuchsaufbau ermöglichte den Nachweis der Goloco- $G\alpha i$ -Interaktion, welcher allerdings für alle analysierten Goloco-Motive, unabhängig der untersuchten Aminosäure an Position 567, erbracht werden konnte. Damit kann eine Phosphorylierung an Position 567 die Bindung von $G\alpha i$ an das 2. Goloco-Motiv des GPSM1 nicht unterbinden (Abb. 40, 41).

4.3.2 Reversible Dissoziation des Goloco- $G\alpha i$ -Komplexes nach $G\alpha i$ -gekoppelter Rezeptoraktivierung

Die Untersuchung des Einflusses der GPCR-Aktivität auf die Goloco- $G\alpha i$ -Interaktion zeigte nach Stimulation $G\alpha i$ -gekoppelter Rezeptoren eine deutliche Abnahme der FRET-Ratio, welche nach Auswaschung des Liganden wieder den Basiswert erreichte (Abb. 42). Diese Abnahme lässt auf eine rezeptoraktivitätsabhängige, reversible Dissoziation der Fluorophore und somit des Goloco- $G\alpha i$ -Komplexes schließen (Abb. 61). In ähnlicher Weise ist diese FRET-Ratioabnahme bei fluorophormarkierten $G\alpha i$ - $G\beta\gamma$ -Untereinheiten nach Rezeptoraktivierung zu beobachten¹³¹. Dieser Mechanismus konnte neben HEK 293-Zellen ebenfalls in NRCM und adulten Rattenkardiomyozyten (nicht im Ergebnisteil enthalten) gezeigt werden. Wie das einzelne Goloco-Motiv, dissoziierte die kurze Cer-gelabelte Isoform des GPSM1 nach GPCR-Aktivierung.

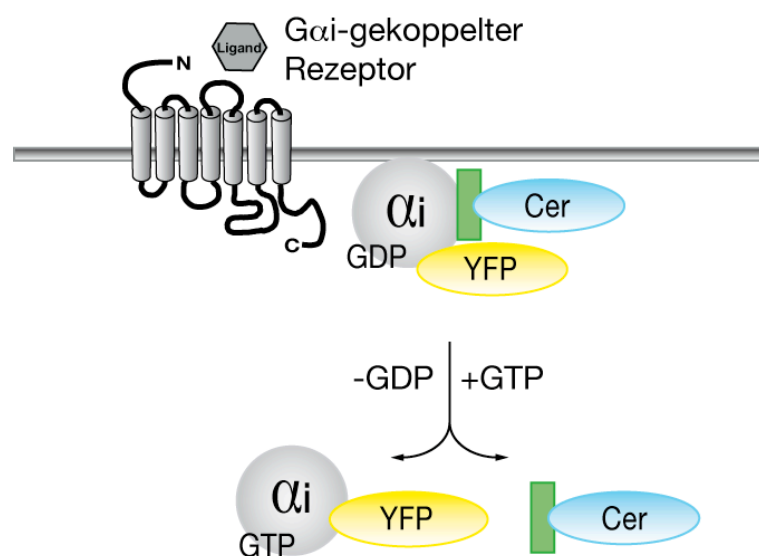


Abbildung 61: Hypothetisches Schema der Goloco-Cer- $G\alpha i$ -YFP-Dissoziation nach $G\alpha i$ -gekoppelter Rezeptoraktivierung. $G\alpha i$ (in grau dargestellt) koppelt an den aktivierten Rezeptor, es erfolgt ein Austausch von GDP zu GTP und die Dissoziation des Goloco (grün)-Cer- $G\alpha i$ -YFP-Komplexes.

Parallel zu dieser Arbeit konnten kürzlich Oner et al. in einem *Bioluminescence resonance energy transfer* (BRET)-basierten Versuchsaufbau die Goloco-G α i-Dissoziation nach Aktivierung von G α i-gekoppelten Rezeptoren zeigen¹³². Sie demonstrierten zudem, dass die rezeptorabhängige Dissoziation des Goloco-G α i-Komplexes nach Pertussis-Toxin (PTX)-Vorbehandlung nicht mehr möglich ist. PTX verhindert durch ADP-Ribosylierung von G α i die Kopplung von G α i an den Rezeptor. Da die Komplexbildung selbst durch die PTX-Behandlung unbeeinflusst blieb, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Dissoziation des Goloco-G α i-Komplexes durch eine Kopplung von G α i an GPCRs zustande kommt. Ob diese Rezeptorkopplung allerdings für den GPSM1-G α i-Komplex in gleicher Weise wie für G α i-G $\beta\gamma$ erfolgt, bleibt noch zu klären.

4.3.3 Einfluss von phosphorylierungsspezifischen Mutanten und PKA-Stimulation auf die Goloco-G α i-Dissoziation

Für die Goloco-Motive konnte unabhängig des Aminosäureaustausches an Position 567 sowohl die Bindung an G α i als auch die rezeptoraktivitätsabhängige Dissoziation beobachtet werden. Die PKA-Stimulation mit 8-Bromo-cAMP allein hatte keinen Einfluss auf die FRET-Ratio, verhinderte jedoch in HEK 293-Zellen die Rückkehr der FRET-Ratio auf den ursprünglichen Basiswert nach vorangegangener Clonidin-induzierter Dissoziation (Abb. 43). Da dies allerdings neben Goloco S567 auch für Goloco S567A beobachtet werden konnte, ist dieses Phänomen nicht auf eine Phosphorylierung des Goloco-Motivs an Position 567 zurückzuführen (Abb. 43). Eine weitere Phosphorylierung des Goloco-Motivs an anderer Position kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch lässt die *in vitro* Phosphorylierung in NRCM neben Serin 567 keine zusätzlichen PKA-abhängigen Phosphorylierungsstellen vermuten (Abb. 38). Möglich wäre eine Modifikation anderer an der Dissoziation beteiligter Komponenten, zum Beispiel GPCRs oder G α i. Für β_2 -adrenerge Rezeptoren konnte bereits eine gesteigerte Kopplung zu G α i nach PKA-vermittelter Phosphorylierung der Rezeptoren gezeigt werden¹³³. Dieser Regulationsmechanismus wird möglicherweise auch für die α_{2A} -überexprimierten Rezeptoren genutzt. PKA-vermittelte Phosphorylierung von α_{2A} -adrenergen Rezeptorinteraktionspartnern ist ebenfalls beschrieben. Die Bindung von Spinyophilin an α_{2A} -adrenerge Rezeptoren wird durch PKA-Phosphorylierung reguliert¹³⁴. Ob die Applikation von 8-Bromo-cAMP wirklich die Reassoziierung des Goloco-G α i-Komplexes verhindert oder eventuell die Konformation der Bindungspartner nach Dissoziation durch 8-Bromo-cAMP beeinflusst wird, bleibt noch zu klären.

8-Bromo-cAMP verhinderte nur in HEK 293-Zellen, nicht aber in NRCM die Rückkehr der FRET-Ratio auf den Basiswert (Abb. 47). Da in NRCM endogene muskarinerge Rezeptoren zur Stimulation der $G\alpha i$ -Signaltransduktion genutzt wurden, kann es sich um einen α_{2A} -rezeptorspezifischen Mechanismus handeln. Es können auch andere zelluläre Faktoren, wie etwa die Anzahl der verfügbaren Rezeptoren, eine Rolle spielen. Ob es sich bei dem 8-Bromo-cAMP-vermittelten Effekt in HEK 293-Zellen um einen physiologisch relevanten Mechanismus handelt, bleibt bis dahin offen.

Die Isoprenalin-Stimulation von NRCM hatte keinen Effekt auf den Goloco- $G\alpha i$ -Komplex (Abb. 46), führte allerdings nach Überexpression β_1 -adrenerger Rezeptoren zur Dissoziation des Komplexes (Abb. 48). Diese Dissoziation ist nicht auf eine Phosphorylierung von Serin 567 zurückzuführen, da die S567A-Mutante ebenfalls diese Abnahme der FRET-Ratio zeigte. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Goloco- $G\alpha i$ -Komplex in unterschiedlicher Weise oder sogar an andere GPCRs als der $G\alpha i$ - $G\beta\gamma$ -Komplex koppelt, ist eine nicht-physiologische Kopplung von $G\alpha i$ an die überexprimierten β_1 -adrenergen Rezeptoren wahrscheinlich. Die Klärung dieser Frage wurde im Zuge dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Ebenso wie für die Goloco-S567-Mutanten konnte die Abnahme der FRET-Ratio nach Rezeptoraktivierung für die getesteten Mutanten der kurzen GPSM1-Isoform beobachtet werden (Abb. 50). Für die durchgeführten FRET-Experimente wurde ein C-terminal-Cermarkiertes GPSM1 verwendet. Möglicherweise findet in diesem Konstrukt der Energietransfer von Cer auf YFP vorwiegend durch die Bindung von $G\alpha i$ -YFP an das 4. Goloco-Motiv statt. In diesem Fall besteht die Gefahr, dass S567-bedingte Unterschiede maskiert werden. Da jedoch ein kooperativer Effekt der vier Goloco-Motive, bedingt durch eine GPSM1-Konformationsänderung nach sequenzieller $G\alpha i$ -Bindung, angenommen wird^{100,132}, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Phosphorylierung von Serin 567 auch die restlichen Goloco- $G\alpha i$ -Interaktionen des GPSM1 beeinflusst. Die qualitative FRET-Analyse der S567-spezifischen Mutanten zeigte jedoch, dass zumindest eine generelle Bindung von $G\alpha i$ an GPSM1 durch die getesteten S567-Mutationen nicht unterbunden wird.

4.3.4 Quantitative Analyse der GPSM1- $G\alpha i$ -Dissoziation

Die Quantifizierung der FRET-Ratioänderung nach GPCR-Aktivierung zeigte für GPSM1-S567E im Gegensatz zur S567D-Mutante eine signifikant geringere Änderung der FRET-Ratio (Abb. 51 (A)). Die Imitation der Phosphorylierung an Position 567 erfolgte somit von der S567D- und S567E-Mutante nicht gleichwertig. Beide Mutanten unterscheiden sich strukturell nur in einer Methylgruppe; der zur Imitation der Phosphorylierung wahrscheinlich

ausschlaggebende negativ geladene Säurerest ist in beiden Aminosäuren vorhanden (Abb. 62). Unabhängig von der Ladung kommt jedoch Aspartat der Aminosäurestruktur eines phosphorylierten Serins näher.

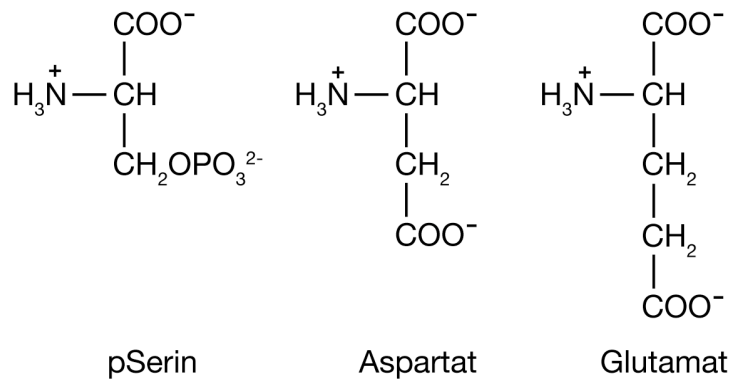


Abbildung 62: Aminosäurestruktur von phosphoryliertem Serin (pSerin), Aspartat und Glutamat.

Um in einer weiteren, S567D- und S567E-unabhängigen Analyse die FRET-Ratioänderung in Abhängigkeit von Serin 567 zu untersuchen, wurde ein quantitativer Vergleich der Dissoziation von GPSM1 S567-G α i und GPSM1 S567A-G α i nach Rezeptoraktivierung unter basalen und PKA-aktivierenden Bedingungen vorgenommen. Eine zusätzliche Forskolin-induzierte PKA-Aktivierung verstärkte, jedoch nicht signifikant, die CCH-vermittelte Dissoziation von GPSM1 S567-G α i. Diese erhöhte Dissoziation konnte ebenfalls für GPSM1 S567A-G α i beobachtet werden und ist daher auf eine andere Ursache als die Phosphorylierung an Serin 37 zurückzuführen (Abb. 51 (B)). Eine Modulation der G α i-Rezeptorkopplung durch PKA-aktivierende Mechanismen kann auch hier in Betracht gezogen werden.

Diese Tendenz zu erhöhter Dissoziation nach zusätzlicher Forskolin-Stimulation steht im Gegensatz zu der geringeren Dissoziation der S567E-Mutante. Möglicherweise beeinflusst die S567E-Mutation andere posttranslationale Modifikationen des GPSM1, was sich auf die Dissoziation des GPSM1 S567E-G α i auswirkt. Die S567E-Mutante zeigte konträr zu den restlichen N-terminal HA-gelabelten GPSM1-Konstrukten im Western Blot ein abweichendes Proteinbandenmuster. Im GPSM1 S567E fehlte die am langsamsten migrierende Bande, stattdessen wurde eine zusätzliche, etwas tiefer laufende Bande im Western Blot detektiert (Abb. 63). Groves et al. beobachteten ein ähnliches Laufverhalten einer phosphorylierungsdefizienten Mutante des GPSM1¹³⁵. Eine proteolytische Spaltung des C-terminalen Endes des GPSM1 kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dies wäre eine weitere

Erklärung für die geringere FRET-Ratioabnahme der S567E-Mutante. Bei gleicher Basisratio würde nach Rezeptoraktivierung nur eine kleine Änderung der FRET-Ratio erfolgen.

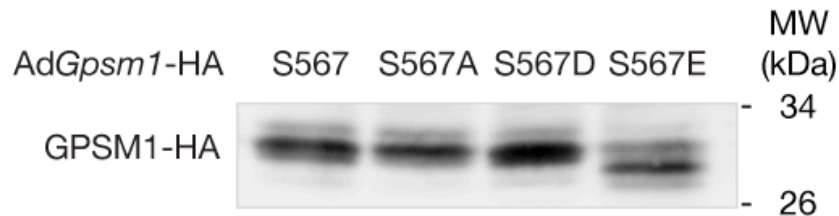


Abbildung 63: Western Blot von NRCM-Lysaten, die mit AdGpsm1-HA (ifu=50) infiziert wurden. Während alle Konstrukte drei Banden auf gleicher Höhe zeigen, wird für die S567E-Mutante ein abweichendes Bandenmuster beobachtet.

Da GPSM1 S567 und GPSM1 S567A in Gegenwart von Forskolin keine Anzeichen unterschiedlicher Dissoziation zeigten, imitiert sehr wahrscheinlich die S567D-Mutation die Phosphorylierung an Serin 567 besser als die S567E-Mutante. Es bleibt offen, ob Serin 567 in einem GPSM1-G α i-bestehenden Komplex phosphoryliert wird. Allerdings kann angenommen werden, dass im dissoziierten Zustand eine Phosphorylierung von Serin 567 stattgefunden haben muss. Da sich die FRET-Ratio nach CCH-Auswaschung in Gegenwart von Forskolin völlig reversibel verhielt, wird daher zumindest die Reassoziations nicht durch eine Phosphorylierung am Serin 567 beeinflusst.

Prinzipiell gibt die Quantifizierung der FRET-Ratioänderung nur Auskunft über die Dissoziation des GPSM1-G α i-Komplexes nach Rezeptoraktivierung. Eine unterschiedliche, S567-abhängige Bindung des GPSM1 zu G α i oder ein Einfluss auf die GDI-Aktivität der Golocomotive¹²² steht zwar im Zusammenhang mit der GPSM1-G α i-Dissoziation, kann allerdings mit dem verwendeten System nicht ausreichend sensitiv analysiert werden. Da die ColP-Experimente der einzelnen GPSM1-Konstrukte mit G α i jedoch relativ vergleichbare Affinität aller GPSM1-Konstrukte zu G α i zeigten, scheint die Bindung von GPSM1 und G α i unbeeinflusst des Aminosäureaustausches von Serin 567 zu Alanin, Aspartat oder Glutamat zu erfolgen. Unterschiede einer S567-bedingten Kopplung des GPSM1-G α i-Komplexes an den Rezeptor sind mit diesem Versuchsaufbau ebenfalls nur schwer zu untersuchen. Es ist im Moment noch nicht klar, in welcher Weise der GPSM1-G α i-Komplex an die Rezeptoren koppelt. Um jedoch eine Analyse der S567-bedingten Rezeptorkopplung durchzuführen, bedarf es zuerst der Aufklärung dieses Mechanismus.

Bislang wurde nur der Einfluss der S567-Phosphorylierung auf die $G\alpha i$ -Interaktion in der kurzen Isoform des GPSM1 analysiert. Das massenspektrometrisch detektierte S567-Phosphopeptid kann nicht eindeutig der langen oder kurzen Isoform des GPSM1 zugeordnet werden, weshalb dieses Phosphopeptid ebenso aus der langen Isoform stammen kann. Die lange Isoform des GPSM1 stellt einen interessanten Ausgangspunkt für eine weitere Analyse der S567-abhängigen GPSM1- $G\alpha i$ -Interaktion dar. Du et al. konnten durch intramolekulares FRET für GPSM2, das Gruppe II Mitglied der Aktivatoren der G-Protein Signaltransduktion mit der höchsten Homologie zu GPSM1, das Verhalten eines molekularen Schalters nachweisen¹³⁶. In geschlossenem Zustand interagierten N- und C-Terminus des GPSM2, was durch die Bindung von $G\alpha i$ aufgehoben wurde. Ob eine Phosphorylierung des Serin 567 in der langen Isoform des GPSM1 in Kooperation mit einer $G\alpha i$ -Bindung eine ähnliche Änderung der Konformation mit sich bringt, bleibt noch zu überprüfen. Das in dieser Arbeit konstruierte FRET-System kann für diese Analyse auf die lange Isoform des GPSM1 angewendet werden. Zusätzlich bietet sich eine am N- und C-Terminus unterschiedlich fluorophormarkierte Variante der langen Isoform des GPSM1 zur Untersuchung einer phosphorylierungsbedingten intramolekularen Konformationsänderung an.

4.3.5 Gesteigerte, basale ERK1/2-Phosphorylierung nach GPSM1-Überexpression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung $G\alpha i$ -gekoppelter Rezeptoren der GPSM1- $G\alpha i$ -Komplex in ähnlicher Weise wie der $G\alpha i$ - $G\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Obwohl eine direkte Bindung von GPSM1 an $G\beta\gamma$ nicht bekannt ist, wurde ein möglicher Einfluss von GPSM1 und dessen Mutanten auf die Signaltransduktion der $G\beta\gamma$ -Untereinheit nach Rezeptoraktivierung untersucht. $G\beta\gamma$ führt nach Stimulation $G\alpha i$ -gekoppelter Rezeptoren zur Aktivierung des MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalwegs^{137,138}, was eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 zur Folge hat. Um Unterschiede in der $G\beta\gamma$ -Signaltransduktion zu erfassen, wurde die ERK1/2-Phosphorylierung nach Überexpression von GPSM1 und den S567-Mutanten unter basalen sowie rezeptoraktivierenden Bedingungen in NRCM betrachtet.

Die Stimulation $G\alpha i$ -gekoppelter Rezeptoren mit CCH bewirkte keine Veränderung der ERK1/2-Phosphorylierung zwischen GPSM1-überexprimierenden Zellen und der Kontrollgruppe (Abb. 52). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Traver et al., die nach Überexpression der isolierten Goloco-Domäne des RGS14 eine Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung nach CCH-Stimulation in HEK 293-Zellen beobachten konnten¹³⁹. Obwohl die einzelnen Goloco-Motive eine ähnliche Struktur besitzen, können neben zellulär beding-

ten Unterschieden proteinspezifische Regulationsmechanismen für bestimmte Goloco-Motive nicht ausgeschlossen werden. Die zusätzliche Applikation von Forskolin zur Aktivierung PKA-vermittelter Signalwege zeigte ebenfalls keine Unterschiede der ERK1/2-Phosphorylierung. Damit ist ein Einfluss von PKA auf die ERK1/2-Aktivierung unabhängig von der Phosphorylierung an Position 567 des GPSM1.

Die basale ERK1/2-Phosphorylierung GPSM1-überexprimierender Zellen zeigte deutlich erhöhte Wert im Vergleich zur Kontrolle, jedoch unabhängig von Serin 567 (Abb. 52). Diese gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 unter basalen Bedingungen ist sehr wahrscheinlich auf die erhöhte Konzentration freier $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zurückzuführen, bedingt durch eine kompetitive Bindung von GPSM1 an $G\alpha i$ ¹⁴⁰. CoIP-Experimente bestätigten die bisher nur mit rekombinanten Proteinen gezeigte kompetitive Bindung der $G\beta\gamma$ -Untereinheit und GPSM1 an $G\alpha i$ in HEK 293-Zellen¹⁴⁰ (Abb. 53). Alle GPSM1-Proteine waren unabhängig von der untersuchten Aminosäure an Position 567 in der Lage, $G\alpha i$ zu binden und dabei endogenes $G\beta\gamma$ aus dem $G\alpha i\beta\gamma$ -Komplex zu verdrängen.

4.3.6 Stimulationsabhängige Änderung der GPSM1-Lokalisation in NRCM

Die Immunofluoreszenz der kurzen Isoform des GPSM1-HA zeigte unter basalen Bedingungen neben dem Zytosol eine deutliche nukleäre Lokalisation aller GPSM1-Konstrukte in NRCM (Abb. 54). Das Zytosol als Lokalisationsort ist für die lange und kurze Isoform des GPSM1 bereits beschrieben, wobei beide Isoformen klare Unterschiede in der zytosolischen Lokalisation in COS-Zellen aufwiesen^{97,125}. Eine nukleäre Lokalisation der kurzen Isoform des GPSM1 in NRCM war bislang noch nicht bekannt. Diese nukleäre Lokalisation des GPSM1 scheint einem Exportin 1-vermittelten Export ins Zytosol zu unterliegen, da Leptomycin B (LMB), ein Exportin 1-Inhibitor, die nukleäre Lokalisation des GPSM1 weiter verstärkte¹⁴¹. Shu et al. konnten für RGS14 bereits einen Exportin 1-abhängigen nukleären Export, vermittelt durch die Goloco-Domäne, demonstrieren¹⁴².

Exportin 1 reguliert den nukleären Export von Proteinen, die ein Leucin-reiches nukleäres Exportsignal (NES) besitzen¹⁴³. Die NESbase Datenbank¹⁴⁴ gibt für die kurze Isoform des GPSM1 ein potientes Leucin-reiches NES (Aminosäure 575 bis 578) an (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/NESbase>) (Abb. 64). Es ist bekannt, dass der nukleäre Export und Import oft der Regulation durch Phosphorylierung unterliegt^{145,146}. Obwohl Serin 567 in unmittelbarer Nähe der potentiellen NES-Sequenz liegt, zeigte die Mutation des Serin 567 zu Alanin oder Aspartat keine Veränderung der nukleären Lokalisation unter basalen

Bedingungen. Ob es sich bei der potentiellen Leucin-reichen NES jedoch um ein echtes Exportsignal handelt, muss weiter, beispielsweise durch Mutationsanalysen, geklärt werden.

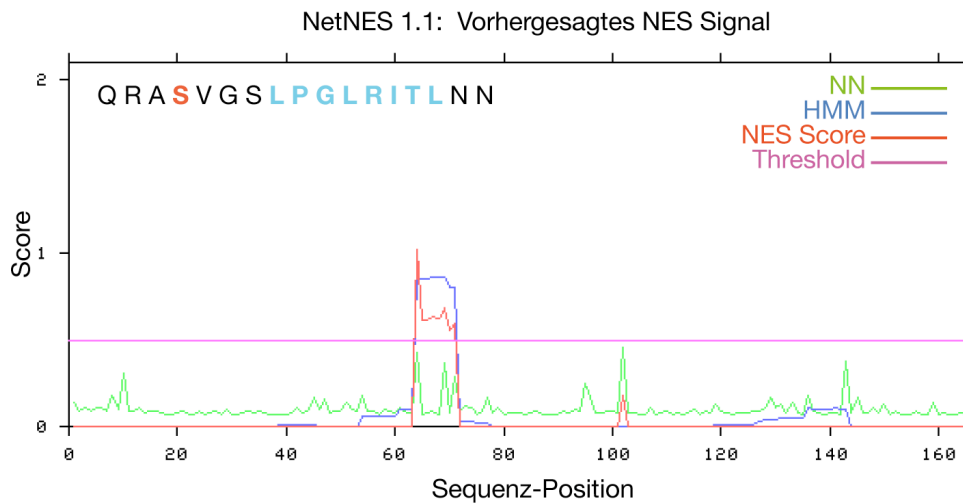


Abbildung 64: NESbase Datenbank-Vorhersage einer Leucin-reichen nukleären Exportsequenz (NES) in der kurzen Isoform des GPSM1¹⁴⁴. Der Auszug aus der AS-Sequenz des GPSM1 (Aminosäure 564 bis 580) beinhaltet in rot Serin 567, in blau das potentielle Leucin-reiche nukleäre Exportsignal (Aminosäure 571 bis 578).

Während die S567-Konstrukte keine offensichtlichen Unterschiede der nukleären Lokalisation zeigten, konnte durch die Aktivierung verschiedener Signalwege ($G\alpha s$, $G\alpha q$) der nukleäre Export von GPSM1 induziert werden (Abb. 67). Möglicherweise benutzen unterschiedliche Kinasen eine gemeinsame Phosphorylierungsstelle in GPSM1 oder kooperative Effekte mehrerer unterschiedlicher Phosphorylierungsstellen vermitteln den nukleären Export von GPSM1. Ein Einfluss der Phosphorylierung von Serin 567 auf die Regulation der zellulären Lokalisation kann nicht ausgeschlossen werden, alleine kontrolliert Serin 567 allerdings nicht den nukleären Export oder Import von GPSM1. Eine $G\alpha i$ -vermittelte Änderung der zellulären Lokalisation von GPSM1 ist möglich, ein gemeinsamer nukleärer Export ist jedoch unwahrscheinlich. Obwohl $G\alpha i$ selbst bereits im Zellkern detektiert wurde¹⁴⁷, ist der Kern nicht der typische Aufenthaltsort von $G\alpha i$. Eine Co-Expression von $G\alpha i$ und GPSM1 bewirkte jedenfalls keine offensichtliche Veränderung der zellulären Lokalisation des GPSM1.

Es steht fest, dass innerhalb der Zelle ein großer Anteil von GPSM1 frei von $G\alpha i/t/o$ vorliegt¹⁴⁸. Dieser ungebundene GPSM1-Anteil lässt im Hinblick auf die nukleäre Lokalisation des GPSM1 zusätzliche, eventuell $G\alpha i$ -unabhängige Mechanismen der GPSM1-Signaltransduktion vermuten. Einen wichtigen Ansatzpunkt für eine weitere GPSM1-Signaltransduktion stellen bekannte Interaktionspartner des GPSM1 dar, zum Beispiel die Serin/Threonin Kinase LKB1. Interessanterweise ist auch für LKB1 ein Exportin 1-

abhängiger Transport vom Zellkern ins Zytosol beschrieben¹⁴⁹. LKB1 bindet die lange Isoform des GPSM1. Über die Funktion der Interaktion von LKB1 und GPSM1 ist bisher nichts bekannt, jedoch weisen beide Proteine β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstellen auf. Eine gemeinsame Regulation durch PKA-Phosphorylierung konnte bereits für AMPK (5'-AMP-aktivierte Kinase), einem Substrat von LKB1, beobachtet werden¹⁵⁰. Phosphorylierung von AMPK reduzierte die LKB1-vermittelte Aktivierung¹⁵¹. Diese β -adrenerge Regulation von LKB1 und seinen Bindungspartnern lässt eine funktionelle Analyse der LKB1-GPSM1-Interaktion bezüglich der Phosphorylierungsstelle Serin 567 als durchaus sinnvoll erscheinen. Eine weitere Funktion der Phosphorylierung von Serin 567 wäre die Regulation der Stabilität von GPSM1. Kürzlich konnte die Deubiquitinase USP9x (Ubiquitin spezifische Protease) als neuer Interaktionspartner der Goloco-Region des GPSM1 identifiziert werden¹⁵². Dieses Enzym reguliert die Stabilität seiner Substrate, indem es deren Abbau verhindert¹⁵³. Xu et al. zeigten einen Rückgang der Proteinkonzentrationen der langen Isoform von GPSM1 nach *Knockdown* von USP9x. Da diese reduzierte GPSM1-Proteinkonzentration erst nach 90-prozentiger Abnahme von USP9x zu beobachten war, reguliert USP9x vermutlich nur einen kleinen Pool von GPSM1 innerhalb der Zelle. Ob diese Regulation eventuell durch unterschiedliche Lokalisation¹⁵⁴ oder Phosphorylierung von GPSM1 zustande kommt, ist nicht bekannt. Die Phosphorylierung von Serin 567 stellt insbesondere im Hinblick auf das andere Bandenmuster der S567E-Mutante im Western Blot einen möglichen Ansatzpunkt für eine Regulation der GPSM1-Stabilität dar.

Ausgehend von der Charakterisierung von Serin 567 des GPSM1 konnten in dieser Arbeit viele neue Erkenntnisse zur zellulären Regulation des GPSM1 gewonnen werden. Obwohl die Funktion der Phosphorylierung von Serin 567 noch nicht geklärt ist, stellt Serin 567 als neue β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstelle einen interessanten Ausgangspunkt für nachfolgende Analysen des GPSM1 dar.

5 Zusammenfassung

Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein Schlüsselmechanismus der zellulären Signaltransduktion. Im Herzen ist die Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren mit der Phosphorylierung zahlreicher Proteine verbunden, die in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungszustandes die kardialen Funktionen maßgeblich beeinflussen. Zur Identifikation neuer Phosphorylierungsstellen wurde eine massenspektrometrische Charakterisierung des murinen kardialen Phosphoproteoms mit besonderem Fokus auf β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstellen durchgeführt.

Die Analyse β -adrenerg stimulierter Mausherzen identifizierte insgesamt 430 Phosphopeptide, darunter zahlreiche, bislang unbekannte Phosphorylierungen kardialer Proteine. 88 dieser Phosphopeptide konnten ausschließlich nach Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren, nicht jedoch in Kontrollherzen, detektiert werden. Eine zusätzliche relative Quantifizierung ausgewählter Phosphorylierungsstellen mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) zeigte für vier neue Phosphorylierungsstellen eine ausgeprägte β -adrenerge Regulation. Diese vier Phosphopeptide enthalten alle eine Proteinkinase A (PKA)-Konsensussequenz. Zusammen mit den anderen 35 PKA-Konsensussequenzen der 88 spezifisch in β -adrenerg stimuliertem Gewebe detektierten Phosphopeptide bilden diese Phosphorylierungsstellen die Grundlage für die weiterführende Analyse β -adrenerger Signalwege.

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die funktionelle Charakterisierung der Phosphorylierung an Serin 37 des MYOZ2 und Serin 567 des G protein signaling modulator 1 (GPSM1), beides erstmals in dieser Arbeit nachgewiesene β -adrenerg regulierte Phosphorylierungsstellen.

MYOZ2 zeigte in der funktionellen Untersuchung der Phosphorylierungsstelle Serin 37 eine bis dahin unbekannte nukleäre Lokalisation, die von dem neu generierten pS37-spezifischen Antikörper bestätigt wurde. Eine Mutationsanalyse des Serin 37 lieferte jedoch keine Hinweise auf eine Serin 37-bedingte Regulation der zellulären Lokalisation des MYOZ2. Zur weiteren Charakterisierung von Serin 37 erfolgte eine Analyse der Interaktion von MYOZ2 und dessen Bindungspartnern. Diese Interaktionsanalyse führte jedoch ebenso wie die Analyse der negativen Regulation der Calcineurin-Aktivität zu keinem Hinweis bezüglich einer Abhängigkeit von Serin 37. Die Rolle der Phosphorylierung von Serin 37 des MYOZ2 konnte mit den durchgeführten Analysen nicht abschließend geklärt werden und benötigt weitere Untersuchungen dieser Phosphorylierungsstelle.

Serin 567 des GPSM1 ist Bestandteil eines der vier Goloco-Motive des GPSM1. Diese Struktur motive vermitteln die Bindung des GPSM1 an das G-Protein $G\alpha_i$. Im Zuge dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der GPSM1- $G\alpha_i$ -Bindung ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basiertes Verfahren entwickelt, das eine Interaktionsanalyse des isolierten Goloco-Motivs sowie des GPSM1-Gesamtproteins mit $G\alpha_i$ erlaubte. Mit diesem System konnte eine reversible Dissoziation des $G\alpha_i$ -Goloco-Komplexes nach Aktivierung $G\alpha_i$ -gekoppelter Rezeptoren gezeigt werden. Die Mutation von Serin 567 zu Alanin, Asparat oder Glutamat verhinderte nicht die Interaktion von $G\alpha_i$ -Goloco oder die Dissoziation nach Rezeptoraktivierung. Die erstmalig detektierte, basal erhöhte Phosphorylierung der Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) nach GPSM1-Überexpression konnte in keinen Zusammenhang mit der Phosphorylierung an Position 567 gebracht werden. Für GPSM1 wurde eine Exportin 1-abhängige, nukleäre Lokalisation in NRCM beobachtet, die durch Aktivierung $G\alpha_s$ - und $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren reguliert wurde. Diese Ergebnisse belegen bislang unbekannte (Phosphoserin 567-unabhängige) Regulationsmechanismen von GPSM1.

6 Summary

Phosphorylation is a key regulatory mechanism, which allows the modulation of cellular signaling pathways. In the heart, the activation of β -adrenergic receptors leads to the phosphorylation of several downstream target proteins that can influence cardiac function. In this study a mass spectrometry-based approach was used for characterizing the cardiac phosphoproteome focusing specifically on β -adrenergic regulated phosphosites.

The mass spectrometry analysis of murine β -adrenergic stimulated or inhibited hearts revealed 430 phosphopeptides, which included several unknown phosphopeptides of important cardiac proteins. 88 of these phosphopeptides could only be detected after β -adrenergic receptor activation. A relative quantification of selected sites with multiple reaction monitoring (MRM) confirmed four newly identified sites as highly β -adrenergic regulated. These four phosphopeptides contained a protein kinase A (PKA) consensus motif and together with the other 35 potential PKA-targets specifically detected in β -adrenergic tissue form interesting starting points for further analysis.

Next, based on the mass spectrometry analysis, the functional characterization of two newly identified PKA-phosphosites namely serine 37 of myozenin-2 (MYOZ2) and serine 567 of G protein signaling modulator 1 (GPSM1) was performed. Both of these sites showed a high extent of β -adrenergic regulation in the MRM measurement.

The functional analysis of MYOZ2 revealed a so far unknown nuclear localization, which was additionally confirmed by the newly generated pS37-specific antibody. However, the mutation analysis of the serine 37 phosphosite gave no hint of its involvement in the nuclear localization of MYOZ2. Moreover, an investigation of the interaction analysis of known binding partners of MYOZ2 as well as the investigation of the negative regulation of calcineurin activity did not reveal any serine 37 dependency. Hence, further investigation is required to decipher the functional influence of serine 37.

Serine 567 phosphosite is part of one of the four goloco-motifs of GPSM1. These structural motifs mediate interaction between the GPSM1 and the G protein $G\alpha_i$. To analyze the GPSM1- $G\alpha_i$ interaction a fluorescent resonance energy transfer (FRET)-based system was constructed that allowed the monitoring of the goloco- $G\alpha_i$ as well as the GPSM1- $G\alpha_i$ interaction. Using this approach, the dissociation of the goloco motif- $G\alpha_i$ -complex upon receptor stimulation was uncovered. The mutation of serine 567 to alanin, aspartat or glutamat did not inhibit the goloco- $G\alpha_i$ interaction or its dissociation upon receptor activation. An elevated basal extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation-level was

observed upon overexpression of GPSM1, which could also not be connected to the phosphorylation of serine 567. All GPSM1-proteins showed an exportin 1-controlled nuclear localization, which was regulated through $G\alpha_s$ or $G\alpha_q$ coupled receptor activity.

This study has revealed several (phosphoserine 567 independent) novel regulatory mechanisms of the GPSM1 that contribute to a better understanding of GPSM1.

7 Literaturverzeichnis

1. Zhao, Y. & Jensen, O. N. Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* **9**, 4632-4641 (2009).
2. Mann, M., Ong, S. E., Gronborg, M., Steen, H., Jensen, O. N. & Pandey, A. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* **20**, 261-268 (2002).
3. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. & Mann, M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648 (2006).
4. Hanks, S. K. & Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**, 576-596 (1995).
5. Geilen, C. C., Wieprecht, M. & Orfanos, C. E. The mitogen-activated protein kinases system (MAP kinase cascade): its role in skin signal transduction. A review. *J Dermatol Sci* **12**, 255-262 (1996).
6. Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-414 (1991).
7. Ubersax, J. A. & Ferrell, J. E. J. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 530-541 (2007).
8. Manning, G. Genomic overview of protein kinases. *WormBook* 1-19 (2005).
9. Hunter, T. Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127 (2000).
10. Remenyi, A., Good, M. C. & Lim, W. A. Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 676-685 (2006).
11. Frodin, M., Jensen, C. J., Merienne, K. & Gammeltoft, S. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J* **19**, 2924-2934 (2000).
12. Dodge-Kafka, K. L., Bauman, A. & Kapiloff, M. S. A-kinase anchoring proteins as the basis for cAMP signaling. *Handb Exp Pharmacol* 3-14 (2008).
13. Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J. & Davis, R. J. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**, 1671-1674 (1998).
14. Zhu, G., Fujii, K., Belkina, N., Liu, Y., James, M., Herrero, J. & Shaw, S. Exceptional disfavor for proline at the P + 1 position among AGC and CAMK kinases establishes reciprocal specificity between them and the proline-directed kinases. *J Biol Chem* **280**, 10743-10748 (2005).
15. Shabb, J. B. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* **101**, 2381-2411 (2001).
16. Kemp, B. E., Bylund, D. B., Huang, T. S. & Krebs, E. G. Substrate specificity of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3448-3452 (1975).

17. Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. & Mustelin, T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711 (2004).
18. Hunter, T. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**, 583-605 (1998).
19. Chow, J. P., Poon, R. Y. & Ma, H. T. Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Mol Cell Biol* **31**, 1478-1491 (2011).
20. Arena, S., Benvenuti, S. & Bardelli, A. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2092-2099 (2005).
21. Marx, J. Alzheimer's disease. A new take on tau. *Science* **316**, 1416-1417 (2007).
22. Johnson, G. V. & Stoothoff, W. H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* **117**, 5721-5729 (2004).
23. van Berlo, J. H., Elrod, J. W., Aronow, B. J., Pu, W. T. & Molkentin, J. D. Serine 105 phosphorylation of transcription factor GATA4 is necessary for stress-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011).
24. Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N. & Marks, A. R. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**, 365-376 (2000).
25. Dorn, G. W. n. Adrenergic signaling polymorphisms and their impact on cardiovascular disease. *Physiol Rev* **90**, 1013-1062 (2010).
26. Jones, C. R., Molenaar, P. & Summers, R. J. New views of human cardiac beta-adrenoceptors. *J Mol Cell Cardiol* **21**, 519-535 (1989).
27. Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. & Le Marec, H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* **98**, 556-562 (1996).
28. Gauthier, C., Seze-Goismier, C. & Rozec, B. Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Clin Hemorheol Microcirc* **37**, 193-204 (2007).
29. Dessy, C. & Balligand, J. L. Beta3-adrenergic receptors in cardiac and vascular tissues emerging concepts and therapeutic perspectives. *Adv Pharmacol* **59**, 135-163 (2010).
30. Pott, C., Steinritz, D., Napp, A., Bloch, W., Schwinger, R. H. & Brixius, K. [On the function of beta3-adrenoceptors in the human heart: signal transduction, inotropic effect and therapeutic prospects]. *Wien Med Wochenschr* **156**, 451-458 (2006).
31. Rockman, H. A., Koch, W. J. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206-212 (2002).
32. Chottova, D. M. & Slavikova, J. [Adrenergic regulation of the mammalian heart]. *Cesk Fysiol* **60**, 14-19 (2011).
33. Steinberg, S. F. The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* **85**, 1101-1111 (1999).

34. Xiao, R. P. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* **2001**, re15 (2001).
35. Zhu, W. Z., Zheng, M., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., Kobilka, B. K. & Xiao, R. P. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1607-1612 (2001).
36. Zheng, M., Han, Q. D. & Xiao, R. P. Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. *Sheng Li Xue Bao* **56**, 1-15 (2004).
37. Lohse, M. J., Engelhardt, S. & Eschenhagen, T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* **93**, 896-906 (2003).
38. Weil, J. & Schunkert, H. [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clin Res Cardiol* **95 Suppl 4**, 1-15; quiz 16-7 (2006).
39. Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E. & Lohse, M. J. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**, 454-463 (1993).
40. Neumann, J., Schmitz, W., Scholz, H., von Meyerinck, L., Doring, V. & Kalmar, P. Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* **2**, 936-937 (1988).
41. Brodde, O. E. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* **60**, 405-430 (1993).
42. Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. & Lohse, M. J. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7059-7064 (1999).
43. Liggett, S. B., Tepe, N. M., Lorenz, J. N., Canning, A. M., Jantz, T. D., Mitarai, S., Yatani, A. & Dorn, G. W. n. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707-1714 (2000).
44. Lissandron, V. & Zaccolo, M. Compartmentalized cAMP/PKA signalling regulates cardiac excitation-contraction coupling. *J Muscle Res Cell Motil* **27**, 399-403 (2006).
45. Salazar, N. C., Chen, J. & Rockman, H. A. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1006-1018 (2007).
46. Ozawa, T. Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels (Review). *Mol Med Report* **3**, 199-204 (2010).
47. Bers, D. M. & Perez-Reyes, E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* **42**, 339-360 (1999).
48. Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S., Vest, J. A., Wronska, A. & Marks, A. R. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 511-518 (2006).
49. Morimoto, S., O-Uchi, J., Kawai, M., Hoshina, T., Kusakari, Y., Komukai, K., Sasaki, H., Hongo, K. & Kurihara, S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca²⁺ leak in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 87-92 (2009).

50. Garvey, J. L., Kranias, E. G. & Solaro, R. J. Phosphorylation of C-protein, troponin I and phospholamban in isolated rabbit hearts. *Biochem J* **249**, 709-714 (1988).
51. Zhang, R., Zhao, J. & Potter, J. D. Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca²⁺ affinity of cardiac troponin C. *J Biol Chem* **270**, 30773-30780 (1995).
52. Gaponenko, V., Abusamhadneh, E., Abbott, M. B., Finley, N., Gasmi-Seabrook, G., Solaro, R. J., Rance, M. & Rosevear, P. R. Effects of troponin I phosphorylation on conformational exchange in the regulatory domain of cardiac troponin C. *J Biol Chem* **274**, 16681-16684 (1999).
53. Kunst, G., Kress, K. R., Gruen, M., Uttenweiler, D., Gautel, M. & Fink, R. H. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* **86**, 51-58 (2000).
54. Sadayappan, S., Gulick, J., Klevitsky, R., Lorenz, J. N., Sargent, M., Molkenstin, J. D. & Robbins, J. Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in a {beta}-myosin heavy chain background. *Circulation* **119**, 1253-1262 (2009).
55. Verboomen, H., Wuytack, F., De Smedt, H., Himpens, B. & Casteels, R. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J* **286**, 591-595 (1992).
56. Cantin, G. T., Shock, T. R., Park, S. K., Madhani, H. D. & Yates, J. R. r. Optimizing TiO₂-based phosphopeptide enrichment for automated multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **79**, 4666-4673 (2007).
57. Carr, S. A., Huddleston, M. J. & Annan, R. S. Selective detection and sequencing of phosphopeptides at the femtomole level by mass spectrometry. *Anal Biochem* **239**, 180-192 (1996).
58. Rosenqvist, H., Ye, J. & Jensen, O. N. Analytical strategies in mass spectrometry-based phosphoproteomics. *Methods Mol Biol* **753**, 183-213 (2011).
59. Chen, W. G. & White, F. M. Proteomic analysis of cellular signaling. *Expert Rev Proteomics* **1**, 343-354 (2004).
60. Morandell, S., Stasyk, T., Grosstessner-Hain, K., Roitinger, E., Mechtler, K., Bonn, G. K. & Huber, L. A. Phosphoproteomics strategies for the functional analysis of signal transduction. *Proteomics* **6**, 4047-4056 (2006).
61. Sickmann, A., Mreyen, M. & Meyer, H. E. Identification of modified proteins by mass spectrometry. *IUBMB Life* **54**, 51-57 (2002).
62. Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P. & Jorgensen, T. J. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* **4**, 873-886 (2005).
63. Steen, H., Jebarathirajah, J. A., Rush, J., Morrice, N. & Kirschner, M. W. Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Mol Cell Proteomics* **5**, 172-181 (2006).
64. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599 (1975).

65. Muszynska, G., Dobrowolska, G., Medin, A., Ekman, P. & Porath, J. O. Model studies on iron(III) ion affinity chromatography. II. Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins. *J Chromatogr* **604**, 19-28 (1992).
66. Jensen, O. N. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 391-403 (2006).
67. Eyrich, B., Sickmann, A. & Zahedi, R. P. Catch me if you can: mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics* **11**, 554-570 (2011).
68. Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & White, F. M. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **20**, 301-305 (2002).
69. Thingholm, T. E. & Jensen, O. N. Enrichment and characterization of phosphopeptides by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **527**, 47-56, xi (2009).
70. Tsai, C. F., Wang, Y. T., Chen, Y. R., Lai, C. Y., Lin, P. Y., Pan, K. T., Chen, J. Y., Khoo, K. H. & Chen, Y. J. Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics. *J Proteome Res* **7**, 4058-4069 (2008).
71. Dobson, K. D. & McQuillan, A. J. In situ infrared spectroscopic analysis of the adsorption of aromatic carboxylic acids to TiO₂, ZrO₂, Al₂O₃, and Ta₂O₅ from aqueous solutions. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **56**, 557-565 (2000).
72. Mann, M. & Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-261 (2003).
73. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207 (2003).
74. Tholey, A., Reed, J. & Lehmann, W. D. Electrospray tandem mass spectrometric studies of phosphopeptides and phosphopeptide analogues. *J Mass Spectrom* **34**, 117-123 (1999).
75. Martin, D. B., Eng, J. K., Nesvizhskii, A. I., Gemmill, A. & Aebersold, R. Investigation of neutral loss during collision-induced dissociation of peptide ions. *Anal Chem* **77**, 4870-4882 (2005).
76. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**(11), 601 (1984).
77. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567 (1999).
78. Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschappat, V., Grivet, C., Bourgogne, E. & Leuthold, L. A. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J Mass Spectrom* **39**, 845-855 (2004).
79. Cox, D. M., Zhong, F., Du, M., Duchoslav, E., Sakuma, T. & McDermott, J. C. Multiple reaction monitoring as a method for identifying protein posttranslational modifications. *J Biomol Tech* **16**, 83-90 (2005).

80. Unwin, R. D., Griffiths, J. R., Leverentz, M. K., Grallert, A., Hagan, I. M. & Whetton, A. D. Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high sensitivity. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1134-1144 (2005).
81. Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99 (1987).
82. Wilkins, B. J., Dai, Y. S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., Jones, F., Kimball, T. R. & Molkentin, J. D. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* **94**, 110-118 (2004).
83. Sekar, R. B. & Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* **160**, 629-633 (2003).
84. Miyawaki, A. Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Dev Cell* **4**, 295-305 (2003).
85. Boettcher, J. M., Hartman, K. L., Lador, D. T., Qi, Z., Woods, W. S., George, J. M. & Rienstra, C. M. Membrane-induced folding of the cAMP-regulated phosphoprotein endosulfine- α . *Biochemistry* **47**, 12357-12364 (2008).
86. Dulubova, I., Horiuchi, A., Snyder, G. L., Girault, J. A., Czernik, A. J., Shao, L., Ramabhadran, R., Greengard, P. & Nairn, A. C. ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated phosphoproteins. *J Neurochem* **77**, 229-238 (2001).
87. Paulsson, A. K., Franklin, S., Mitchell-Jordan, S. A., Ren, S., Wang, Y. & Vondriska, T. M. Post-translational regulation of calsarcin-1 during pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 1206-1214 (2010).
88. Sweet, S. M., Bailey, C. M., Cunningham, D. L., Heath, J. K. & Cooper, H. J. Large scale localization of protein phosphorylation by use of electron capture dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **8**, 904-912 (2009).
89. Frey, N., Richardson, J. A. & Olson, E. N. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14632-14637 (2000).
90. Frey, N. & Olson, E. N. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem* **277**, 13998-14004 (2002).
91. von Nandelstadh, P., Ismail, M., Gardin, C., Suila, H., Zara, I., Belgrano, A., Valle, G., Carpen, O. & Faulkner, G. A class III PDZ binding motif in the myotilin and FATZ families binds enigma family proteins: a common link for Z-disc myopathies. *Mol Cell Biol* **29**, 822-834 (2009).
92. Gontier, Y., Taivainen, A., Fontao, L., Sonnenberg, A., van der Flier, A., Carpen, O., Faulkner, G. & Borradori, L. The Z-disc proteins myotilin and FATZ-1 interact with each other and are connected to the sarcolemma via muscle-specific filamins. *J Cell Sci* **118**, 3739-3749 (2005).
93. Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J. M., Frank, D., Rutten, H., Gehring, D., Kuhn, C., Lutz, M., Rothermel, B., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Katus, H. A., Hill, J. A. & Olson, E. N. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med* **10**, 1336-1343 (2004).

94. Jain, J., McCaffrey, P. G., Miner, Z., Kerppola, T. K., Lambert, J. N., Verdine, G. L., Curran, T. & Rao, A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352-355 (1993).
95. Blumer, J. B., Oner, S. S. & Lanier, S. M. Group II activators of G-protein signalling and proteins containing a G-protein regulatory motif. *Acta Physiol (Oxf)* (2011).
96. Blatch, G. L. & Lassle, M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939 (1999).
97. Pizzinat, N., Takesono, A. & Lanier, S. M. Identification of a truncated form of the G-protein regulator AGS3 in heart that lacks the tetratricopeptide repeat domains. *J Biol Chem* **276**, 16601-16610 (2001).
98. Khafizov, K. GoLoco motif proteins binding to Galpha(i1): insights from molecular simulations. *J Mol Model* **15**, 1491-1499 (2009).
99. Kimple, R. J., Willard, F. S. & Siderovski, D. P. The GoLoco motif: heralding a new tango between G protein signaling and cell division. *Mol Interv* **2**, 88-100 (2002).
100. Adhikari, A. & Sprang, S. R. Thermodynamic characterization of the binding of activator of G protein signaling 3 (AGS3) and peptides derived from AGS3 with G alpha i1. *J Biol Chem* **278**, 51825-51832 (2003).
101. Nothjunge, S. AGS3 und Galphai-Protein: Einfluss sitespezifischer Phosphorylierung von AGS3 auf Galphai-Bindung und AGS3-Galphai Aktivierung. *Technische Universität München Institut für Pharmakologie und Toxikologie*, (2011).
102. Sanada, K. & Tsai, L. H. G protein betagamma subunits and AGS3 control spindle orientation and asymmetric cell fate of cerebral cortical progenitors. *Cell* **122**, 119-131 (2005).
103. Zaccolo, M. cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *Br J Pharmacol* **158**, 50-60 (2009).
104. Chu, G., Egnaczyk, G. F., Zhao, W., Jo, S. H., Fan, G. C., Maggio, J. E., Xiao, R. P. & Kranias, E. G. Phosphoproteome analysis of cardiomyocytes subjected to beta-adrenergic stimulation: identification and characterization of a cardiac heat shock protein p20. *Circ Res* **94**, 184-193 (2004).
105. U'Prichard, D. C., Greenberg, D. A. & Snyder, S. H. Binding characteristics of a radiolabeled agonist and antagonist at central nervous system alpha noradrenergic receptors. *Mol Pharmacol* **13**, 454-473 (1977).
106. Greenberg, D. A., Prichard, D. C. & Snyder, S. H. Alpha-noradrenergic receptor binding in mammalian brain: differential labeling of agonist and antagonist states. *Life Sci* **19**, 69-76 (1976).
107. Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E. G. & Bers, D. M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H769-79 (2000).
108. Thingholm, T. E., Jorgensen, T. J., Jensen, O. N. & Larsen, M. R. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc* **1**, 1929-1935 (2006).

109. Thingholm, T. E., Jensen, O. N. & Larsen, M. R. Enrichment and separation of mono- and multiply phosphorylated peptides using sequential elution from IMAC prior to mass spectrometric analysis. *Methods Mol Biol* **527**, 67-78, xi (2009).
110. Ge, Y., Rybakova, I. N., Xu, Q. & Moss, R. L. Top-down high-resolution mass spectrometry of cardiac myosin binding protein C revealed that truncation alters protein phosphorylation state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12658-12663 (2009).
111. Keane, N. E., Quirk, P. G., Gao, Y., Patchell, V. B., Perry, S. V. & Levine, B. A. The ordered phosphorylation of cardiac troponin I by the cAMP-dependent protein kinase--structural consequences and functional implications. *Eur J Biochem* **248**, 329-337 (1997).
112. Ward, D. G., Ashton, P. R., Trayer, H. R. & Trayer, I. P. Additional PKA phosphorylation sites in human cardiac troponin I. *Eur J Biochem* **268**, 179-185 (2001).
113. Zhang, L., Yu, Y., Song, Z., Wang, Y. Y. & Yu, Z. B. Synergistic Effects between Phosphorylation of Phospholamban and Troponin I Promote Relaxation at Higher Heart Rate. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 651627 (2011).
114. Hagemann, D., Kuschel, M., Kuramochi, T., Zhu, W., Cheng, H. & Xiao, R. P. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **275**, 22532-22536 (2000).
115. Fuller, M. D., Emrick, M. A., Sadilek, M., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* **3**, ra70 (2010).
116. Hulme, J. T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T. W., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol* **576**, 87-102 (2006).
117. Takada, F., Vander Woude, D. L., Tong, H. Q., Thompson, T. G., Watkins, S. C., Kunkel, L. M. & Beggs, A. H. Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1595-1600 (2001).
118. Pyle, W. G. & Solaro, R. J. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res* **94**, 296-305 (2004).
119. Shizukuda, Y. & Buttrick, P. M. Isoprotrenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation* **105**(2), E9 (2002).
120. Groban, E. S., Narayanan, A. & Jacobson, M. P. Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. *PLoS Comput Biol* **2**, e32 (2006).
121. Molkenkin, J. D. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res* **87**, 731-738 (2000).
122. De Vries, L., Fischer, T., Tronchere, H., Brothers, G. M., Strockbine, B., Siderovski, D. P. & Farquhar, M. G. Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for G α i subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14364-14369 (2000).
123. Peterson, Y. K., Bernard, M. L., Ma, H., Hazard, S. r., Graber, S. G. & Lanier, S. M. Stabilization of the GDP-bound conformation of G α by a peptide derived from the G-protein regulatory motif of AGS3. *J Biol Chem* **275**, 33193-33196 (2000).

124. Trost, M., English, L., Lemieux, S., Courcelles, M., Desjardins, M. & Thibault, P. The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* **30**, 143-154 (2009).
125. Blumer, J. B., Chandler, L. J. & Lanier, S. M. Expression analysis and subcellular distribution of the two G-protein regulators AGS3 and LGN indicate distinct functionality. Localization of LGN to the midbody during cytokinesis. *J Biol Chem* **277**, 15897-15903 (2002).
126. Blumer, J. B., Bernard, M. L., Peterson, Y. K., Nezu, J., Chung, P., Dunican, D. J., Knoblich, J. A. & Lanier, S. M. Interaction of activator of G-protein signaling 3 (AGS3) with LKB1, a serine/threonine kinase involved in cell polarity and cell cycle progression: phosphorylation of the G-protein regulatory (GPR) motif as a regulatory mechanism for the interaction of GPR motifs with Gi alpha. *J Biol Chem* **278**, 23217-23220 (2003).
127. Collins, S. P., Reoma, J. L., Gamm, D. M. & Uhler, M. D. LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochem J* **345 Pt 3**, 673-680 (2000).
128. Lizcano, J. M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Makela, T. P., Hardie, D. G. & Alessi, D. R. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* **23**, 833-843 (2004).
129. Hollinger, S., Ramineni, S. & Hepler, J. R. Phosphorylation of RGS14 by protein kinase A potentiates its activity toward G alpha i. *Biochemistry* **42**, 811-819 (2003).
130. Kimple, A. J., Yasgar, A., Hughes, M., Jadhav, A., Willard, F. S., Muller, R. E., Austin, C. P., Inglese, J., Ibeanu, G. C., Siderovski, D. P. & Simeonov, A. A high throughput fluorescence polarization assay for inhibitors of the GoLoco motif/G-alpha interaction. *Comb Chem High Throughput Screen* **11**, 396-409 (2008).
131. Nikolaev, V. O., Boettcher, C., Dees, C., Bunemann, M., Lohse, M. J. & Zenk, M. H. Live cell monitoring of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation reveals strong biological activity of close morphine biosynthetic precursors. *J Biol Chem* **282**, 27126-27132 (2007).
132. Oner, S. S., An, N., Vural, A., Breton, B., Bouvier, M., Blumer, J. B. & Lanier, S. M. Regulation of the AGS3.G{alpha}i signaling complex by a seven-transmembrane span receptor. *J Biol Chem* **285**, 33949-33958 (2010).
133. Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem* **277**, 31249-31256 (2002).
134. Xu, J., Chen, Y., Lu, R., Cottingham, C., Jiao, K. & Wang, Q. Protein kinase A phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with the alpha 2A-adrenergic receptor (AR) and alters temporal properties of alpha 2AAR internalization. *J Biol Chem* **283**, 14516-14523 (2008).
135. Groves, B., Abrahamsen, H., Clingan, H., Frantz, M., Mavor, L., Bailey, J. & Ma, D. An inhibitory role of the G-protein regulator AGS3 in mTOR-dependent macroautophagy. *PLoS One* **5**, e8877 (2010).

136. Du, Q. & Macara, I. G. Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* **119**, 503-516 (2004).
137. Tu, H., Rondard, P., Xu, C., Bertaso, F., Cao, F., Zhang, X., Pin, J. P. & Liu, J. Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cell Signal* **19**, 1996-2002 (2007).
138. Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M. & Lohse, M. J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* **15**, 75-83 (2009).
139. Traver, S., Splicing, A., Gaudriault, G. & De Gunzburg, J. The RGS (regulator of G-protein signalling) and GoLoco domains of RGS14 co-operate to regulate Gi-mediated signalling. *Biochem J* **379**, 627-632 (2004).
140. Bernard, M. L., Peterson, Y. K., Chung, P., Jourdan, J. & Lanier, S. M. Selective interaction of AGS3 with G-proteins and the influence of AGS3 on the activation state of G-proteins. *J Biol Chem* **276**, 1585-1593 (2001).
141. Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. & Nishida, E. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**, 308-311 (1997).
142. Shu, F. J., Ramineni, S., Amyot, W. & Hepler, J. R. Selective interactions between Gi alpha1 and Gi alpha3 and the GoLoco/GPR domain of RGS14 influence its dynamic subcellular localization. *Cell Signal* **19**, 163-176 (2007).
143. Kutay, U. & Guttinger, S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* **15**, 121-124 (2005).
144. la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M. & Brunak, S. NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res* **31**, 393-396 (2003).
145. Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. & Pines, J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* **9**, 680-689 (1999).
146. Alt, J. R., Cleveland, J. L., Hannink, M. & Diehl, J. A. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* **14**, 3102-3114 (2000).
147. Crouch, M. F. & Simson, L. The G-protein G(i) regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of G(i). *FASEB J* **11**, 189-198 (1997).
148. Sato, M., Gettys, T. W. & Lanier, S. M. AGS3 and signal integration by Galpha(s)- and Galpha(i)-coupled receptors: AGS3 blocks the sensitization of adenylyl cyclase following prolonged stimulation of a Galpha(i)-coupled receptor by influencing processing of Galpha(i). *J Biol Chem* **279**, 13375-13382 (2004).
149. Dorfman, J. & Macara, I. G. STRADalpha regulates LKB1 localization by blocking access to importin-alpha, and by association with Crm1 and exportin-7. *Mol Biol Cell* **19**, 1614-1626 (2008).

150. Djouder, N., Tuerk, R. D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R. F., Scholz, R., Vaahromeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R. A., Viollet, B., Makela, T. P., Wallimann, T., Neumann, D. & Krek, W. PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis. *EMBO J* **29**, 469-481 (2010).
151. Hurley, R. L., Barre, L. K., Wood, S. D., Anderson, K. A., Kemp, B. E., Means, A. R. & Witters, L. A. Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem* **281**, 36662-36672 (2006).
152. Xu, Z., Xia, B., Gong, Q., Bailey, J., Groves, B., Radeke, M., Wood, S. A., Szumlinski, K. K. & Ma, D. Identification of a deubiquitinating enzyme as a novel AGS3-interacting protein. *PLoS One* **5**, e9725 (2010).
153. Schwickart, M., Huang, X., Lill, J. R., Liu, J., Ferrando, R., French, D. M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., Yue, P., Dornan, D., Huang, D. C. & Dixit, V. M. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* **463**, 103-107 (2010).
154. Xu, Z., Xia, B., Gong, Q., Bailey, J., Groves, B., Radeke, M., Wood, S. A., Szumlinski, K. K. & Ma, D. Identification of a deubiquitinating enzyme as a novel AGS3-interacting protein. *PLoS One* **5**, e9725 (2010).

8 Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Stefan Engelhardt, der mir die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe gegeben hat. Mit seinem großen Enthusiasmus für alle wissenschaftlichen Belange war er mir stets eine Inspirations- und Motivationsquelle. Vielen Dank für die fortwährende Unterstützung der letzten Jahre.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Martin Biel für die Bereitschaft bedanken, die Fachvertretung meiner Doktorarbeit zu übernehmen. Außerdem möchte ich den Herrn Professoren Wagner, Wahl-Schott, Frieß und Zahler danken, als Prüfer zur Verfügung zu stehen.

Ich danke Herrn Prof. Albert Sickmann und der Arbeitsgruppe Sickmann, insbesondere Dr. René Zahedi, dass mir für die Probenaufarbeitung zur massenspektrometrischen Analyse ihr Labor zur Verfügung gestellt und mir mit Rat und Hilfe zur Seite gestanden wurde.

Vielen Dank an alle Kollegen - aktuell sowie ehemalg (insbesondere Sabine Merkle) - die mich durch alle Höhen und Tiefen des Laboralltages in den letzten Jahren begleitet haben und die mir auch außerhalb des Labors als gute Freunde ans Herz gewachsen sind. Vielen Dank Andrea, Astrid, Fabian, Isi, Simon und Thomas für eure Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und Brüdern Werner und Klaus, die immer mit Kritik, Geduld, Unterstützung und Liebe für mich da sind.

Vielen Dank Anna, Caro, Claudi, Nina, Ori und Regina.

9 Lebenslauf

Name:	Petra Göbel
Geburtsdatum:	11.03.1982
Geburtsort:	Ingolstadt

10 Anhang

10.1 Peptidsequenzen der synthetischen Standardpeptide

Tabelle 10.1.1: Peptidsequenzen der verwendeten drei synthetischen Standardpeptide.

Standard	Peptidsequenz
Standard 1	SVENLPEAGIpTHEQR
Standard 2	PQEFSpSVERGR
Standard 3	LIEDNEpYTAR

10.2 MRM-Übergänge der ausgewählten Phosphopeptide

Tabelle 10.2.1: Übersicht der definierten MRM-Übergänge der analysierten Phosphopeptide

Accession+Protein	Peptidsequenz	MRM-Übergänge
Q9DC77, Small muscular protein	RKESTPETEEGAPTSEEK (S3/T4)	729,3 ³⁺ -> 483,27
		729,3 ³⁺ -> 919,44
		729,3 ³⁺ -> 584,32
		729,3 ³⁺ -> 791,38
Q8BG95, Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	RLpSSLFNK	522,8 ²⁺ -> 526,25
		522,8 ²⁺ -> 339,21
		522,8 ²⁺ -> 539,33
		522,8 ²⁺ -> 686,44
Q9JJW5, Myozenin-2	KVpSIPR	390,2 ²⁺ -> 454,28
		390,2 ²⁺ -> 553,35
		390,2 ²⁺ -> 454,28
		390,2 ²⁺ -> 272,17
Q9JJW5, Myozenin-2	VDGSNLEGGSSQQGPSpTPPNTPDPR	829,7 ³⁺ -> 272,17
		829,7 ³⁺ -> 898,39
		829,7 ³⁺ -> 715,33
		829,7 ³⁺ -> 796,39
Q8CC35, Synaptopodin	VASLpSPAR	440,7 ²⁺ -> 612,35
		440,7 ²⁺ -> 343,21
		440,7 ²⁺ -> 412,23
		440,7 ²⁺ -> 525,31
P59017, Bcl-2-like 13 protein	TpSPTPSVFVELGEEEELEAVTARPEAVER	539,7 ²⁺ -> 494,20
		539,7 ²⁺ -> 774,41
		539,7 ²⁺ -> 673,36
		539,7 ²⁺ -> 207,09
Q6IR34, G protein signaling modulator 1	ApSVGSLPGLR	518,8 ²⁺ -> 442,28
		518,8 ²⁺ -> 699,41
		518,8 ²⁺ -> 642,39
		518,8 ²⁺ -> 555,36
Q9ET78, Junctophilin-2	RSDpSAPPSPVSATVPEEEPPAPR	818,38 ²⁺ -> 1021,49
		818,38 ²⁺ -> 499,23
		818,38 ²⁺ -> 537,31
		818,38 ²⁺ -> 359,17

Tabelle 10.2.2: Definierte MRM-Übergänge der verwendeten drei synthetischen Standardpeptide.

Standard	Peptidsequenz	MRM-Übergänge
Standard 1	SVENLPEAGIpTHEQR	587,3 ³⁺ ->1217,5 587,3 ³⁺ -> 609,3 587,3 ³⁺ -> 560,3 587,3 ³⁺ -> 159,1
Standard 2	PQEFSpSVERGR	457,9 ³⁺ -> 425,2 457,9 ³⁺ -> 524,8 457,9 ³⁺ -> 588,8 457,9 ³⁺ -> 226,1
Standard 3	LIEDNEpYTAR	652,3 ²⁺ ->1077,4 652,3 ²⁺ -> 948,3 652,3 ²⁺ -> 833,3 652,3 ²⁺ -> 347,2

10.3 Phosphopeptide mit Zuordnung zu verschiedenen Proteinen

Tabelle 10.3.1: In Isoprenalin-stimuliertem Gewebe gefundene Phosphopeptide, die aufgrund mehrfach möglicher Peptid-Protein Identifikation von der finalen Auswertung ausgeschlossen wurden. In rot sind potentielle PKA Konsensussequenzen gekennzeichnet, in Klammern sind nicht eindeutig definierte Phosphorylierungsstellen enthalten.

RDpSFRR	O70468, Myosin-binding protein C
ATDAEADVApSLNR	Q8C147 Dedicator of cytokinesis protein 8
DpSYVGDEAQSK	P58771, Tropomyosin alpha-1 chain P58774, Tropomyosin beta chain P62737, Actin, aortic smooth muscle Q8BFZ3, Beta-actin-like protein 2 P60710, Actin, cytoplasmic 1 P68033, Actin, alpha cardiac muscle 1 P63260, Actin, cytoplasmic 2 P63268, Actin, gamma-enteric smooth muscle P68134, Actin, alpha skeletal muscle
SRTSVQTEDDQLIAGQSAR, (T3/S4)	P26231, Catenin alpha-1 Q61301, Catenin alpha-2
LEEAGGApTSVQIEMNK	Q02566, Myosin-6 Q91Z83, Myosin-7
QKYEEpSQSELESSQK	Q02566, Myosin-6 Q91Z83, Myosin-7
QAEEAEEQANpTNLSK	Q02566, Myosin-6 Q91Z83, Myosin-7

10.4 Identifiziert Phosphopeptide

Accession	Sequenz	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein
A2AAJ9	AGLApSFR	S5	8372
A2AAJ9	LQVPGGDpSDEETKTPSASPR	S8	6503
A2AAJ9	TGEADLSHTSSDDESR	S10/S11	5744/5745
A2AAJ9	KASLKDpSGEYTCETEASK	S7	3325
A2AAJ9	RMpSREPTLDSISELPEEDSR	S3	5690
A2AJI0	RKPGAGGpSPALAR	S8	401
A2AMM0	LSSVTEDEDQDAALTIVTVLDR	S2/S3	19/20
A2AMM0	GGYSPQEGGDPPpTPEPLK	T13	334
A2AMM0	pSISSAAPSK	S1	257
A2AN08	HVTLPSPSPR	S7	2716
A2ASS6	ISTpSPIR	S4	315
A2ASS6	YSpSPPAHVK	S3	33930
A2ASS6	MpSPAMpSPAR	S2, S6	1420, 1424
A2ASS6	TApSPHFTVSK	S3	814
A2ASS6	VKpSPEPVTSHPK	S3	34470
A2ASS6	KTPpSPIEAER	S4	12871
A2ASS6	VKpSPETVKSPK	S3	34464
A2ASS6	VKSPETVKpSPK	S9	34470
A2ASS6	VKpSPETVKpSPK	S3, S9	34464, 34470
A2ASS6	AVpSPTETKPTK	S3	34488
A2ASS6	TRPRpSPpSPVSSER	S5, S7	34107, 34109
A2ASS6	SVKpSPLLIR	S4	322
A2ASS6	IELSPpSMEAPK	S6	2080
A2ASS6	SRpSPTPPSIAAK	S3	264
A2ASS6	pSPPRFELSSLR	S1	33920
A2ASS6	RRpTPpSPDYDLYYYR	T3, S5	33859, 33861
A2ASS6	AVTpSPPR	S4	34451
A2ASS6	APTPpSPVR	S5	301
A2ASS6	VKpSPEPR	S3	34457
A2ASS6	QQpSPSPIR	S3	281
A6X8Z5	RNpSAPVSVSAVR	S3	1163
O08547	NLGpSINTELQDVQR	S4	137
O08715	RLpSEEACPGVLSVAPTQTQPPGR	S3	55
O08715	RRpSESSGNLPSVADTR	S3	101
O35295	RGGGSGGGDEpSEGEEDDED	S11	316
O35344	NVPQEESELEDpSDVDADFK	S11	60
O35479	DVYLpSPR	S5	205
O35609	KLpSPTEPR	S3	78
O54724	ATEEPSGTGpSDELIK	S10	42
O54724	ATEEPpSGTGpSDELIK	S6, S10	38, 42
O54724	LPAKLpSVSK	S6	169
O54774	HSSLPTepSDEDIAPAQR	S8	760
O54940	KGSITEYTATEEK	S3/T5	114/116
O55028	STSATDTHHVELAR	S1/T2	31/32
O55111	pSLLTAGATHHVR	S1	729
O55111	GpSVGCCSFIEGELDDLFLDDLGLK	S2	814
O55143	EFDELSPpSAQR	S8	663
O55143	IMpSVIR	S3	546
O55143	EWGpSGSDTLR	S4	555
O70373	LGSRPpSIQEQSPLELR	S6	208
O70373	LGpSRPpSIQEQSPLELR	S3, S6	205, 208
O70373	GlpsLEEGALPDVSATR	S3	295
O70373	LGpSRPSIQEQSPLELR	S3	205
O70435	ESLKEEDEpSDDDNM	S9	250

O70468	RDpSKLEAPAEEDVWEILR	S3	307
O70468	RTpSLAGAGR	S3	273
O70468	DAPSPDDQGSYAVIAGSSK	S3	72
O70548	SMpSQAQRG	S3	161
O88448	ASpSLNFLNK	S3	575
P0C7L0	AISGPLPAPApSPR	S11	161
P04247	RHpSGDFGADAQGAMSK	S3	121
P05064	GILAADESTGpSIKR	S11	39
P05064	GILAADEpSTGSIKR	S8	36
P07310	GpTGGVDTAAVGAVFDISNADR	T2	322
P07901	EpSDDKPEIEDVGSDEEEEEKKDGDK	S2	252
P08553	pSPVEEVKPKPEAK	S1	610
P10637	SPVVSgDTpSPR	S9	696
P10637	SPVVpSGDTpSPR	S5/S9	692/696
P10637	TDHGAEIVYKpSPVVSgDTpSPR	T18/S19	688/696
P10637	SGYSpSPGpSPGTPGSR	S5, S8	491, 494
P10711	KKEPAISSQNpSPEAR	S11	100
P11499	IEDVGpSDEEDDSGK	S6	255
P11499	EKElpSDDEAEEEEKGEK	S5	226
P11531	SDSSQPMLLR	S1/S3/S4	3614/3616/3617
P12367	RVpSVCAETFPDEEEEDNDPR	S3	96
P14152	KLpSSAMSAK	S3	241
P14602	SPpSWEFPR	S3	15
P14602	QLpSSGVSEIR	S3	86
P16283	GpSPSGLAPILR	S2	296
P16546	pSLQQLAEER	S1	1217
P20357	VDHGAEIITQpSPSR	S11	1783
P23927	APpSWIDTGLSEMR	S3	59
P26039	VLVQNAAGpSQEK	S9	2040
P26231	TPEELDDpSDFETEDFDVR	S8	641
P26645	AEDGAAPSPSSETPK	S10/S11/T13	140/141/143
P27546	VGpSLDNVGHLPAGGAVK	S3	1046
P27546	RTSPSKPSSAPALKPGPK	S3/S5	760/762
P27546	VGpSTENIK	S3	914
P27546	DMpSPSAETEAPLAK	S3	517
P27546	LATTVpSAPDLK	S6	901
P29699	VMHTQCHSTPDpSAEDVR	S12	138
P29699	HAFSPVASVESApSGETLHSPK	S13	314
P30999	VGGpSSVDLHR	S4	268
P31001	TFGGAPGFSLGpSPLSpSPVFPR	S12, S16	28, 32
P31001	TFGGAPGFSLGpSPLSSPVFPR	S12	28
P31001	TFGGAPGFSLGpSPLSSPVFPR	S16	32
P31001	TSGGAGGLGpSLR	S10	68
P31001	TSGGAGGLGSLR	T1/S2	59/60
P31001	APpSYGAGELLDFSLADAVNQEFLATR	S3	81
P35283	RPAGGSLGAVpSPALSGGQAR	S11	15
P35486	YGMGTpSVER	S6	232
P35486	YHGHpSMSDPGVSYR	S5	293
P35486	YHGHpSMSDPGVpSYR	S5, S12	293, 300
P35564	AEDEILNRpSPR	S10	582
P39447	pSREDLSAQPVQTK	S1	617
P42208	IYHLPDAEpSDEDEDFKEQTR	S9	218
P47757	ELpSQVLTQR	S3	263
P48787	AKEpSLDLR	S4	167
P48962	LAADVKGpSSQR	S9	149
P48962	AAYFGVpYDTAK	Y7	195
P49312	SEpSPKEPEQLRK	S3	6
P49586	TSPpSSSPASLSR	T1/S2, S4	342/343, 345
P49586	SPSPSFR	S1/S3	331/333

P50136	IGHHpSTSDDSSAYR	S5	334
P50136	pSVDEVNYWDK	S1	344
P50462	GIGFGQGAGCLSTDTGEH- LGLQFQQpSPKPAR	S26	95
P51174	IFSpSEHDIFR	S4	55
P51667	RIEGGSSNVFSMF EQTQIQEFK	S6/S7	S14/S15
P51859	AGDVLEDpSPK	S8	165
P52479	TCDpSPQNPVDFISGPVPDSPFPFR	S4	208
P53986	LKpSKEpSLQEAGK	S3, S6	210, 213
P53986	LKpSKESLQEAGK	S3	213
P54071	DQpTNDQVTIDSALATQK	T3	92
P56212	KPpSLVASK	S3	104
P56695	LNATApSLEQDKIEPPR	S6	32
P57776	ATAPQTQHVPSPMR	S10	133
P58771	AISEELDHALNDMTpSI	S15	283
P58771	LVIIEpSDLER	S6	174
P58871	DpSLGSFSTR	S2	866
P59017	TpSPTPSVFVELGEEE- LEAVTARPEAVER	S2	343
P59017	KKpSHTGEAAAVR	S3	387
P60840	KSpSLVTSK	S3	108
P60904	SLpSTSGESLYHVLGLDK	S3	10
P61014	RApSTIEMPQQAR	S3	16
P61014	RApSpTIEMPQQAR	S3, T4	16, 17
P61014	RASpTIEMPQQAR	T4	17
P62071	KFQECECPPpSPEPTR	S10	186
P62908	DEILPTpTPISEQK	T7	221
P70265	RNSFpTPLSSNTIR	T5	469
P70268	TDVSNFDEEFTGEAPTLpSPPR	S18	920
P70271	IHIDPESQDCpSPATSR	S11	111
P70452	QGDNIpSDDDEVR	S6	15
P70670	ADpSPPAVIR	S3	565
P70670	GPVpSPPAR	S4	257
P70670	GAPVPSTGAPPpSPK	S12	765
P70670	GAPNALAESPApSPK	S12	1285
P70670	DAPTTLAESPSPK	S12	1492
P70670	DAPTTLAEpSPSSPK	S9	1489
P70670	QIPTPEDAVTILAGSPLpSPK	S18	1177
P83917	KADpSDESKGEESKPK	S4	89
P97379	SATPPPAEPASLPQEPPK	S1/T3	225/227
P97792	APQpSPTLAPAK	S4	332
P97825	SNSpSEASSGDFLDLK	S1/S3/S4	85/87/88
P97855	STSPAPADVAPAQEDLR	S1/T2/S3	229/230/231
Q0P678	LGVSVPSPSR	S6	530
Q00PI9	pSGDETPGSEAPGDK	S1	159
Q1XH17	ILSEpSPPPAR	S5	255
Q3TCH7	KGpSVSALMGR	S3	10
Q3U0S6	SVpSELSLQGR	S3	322
Q3UH68	pSPEPEATLTFPFLDK	S1	719
Q3UH68	GSSDGRGSDSESDLPHR	S3/S8	226/231
Q3UH68	SRQpTPpSPDVVLR	T4, S6	215, 217
Q3UH68	QTPpSPDVVLR	S4	217
Q3UHHJ0	VGSLTPPpSpSPK	S8, S9	621, 622
Q3UHZ5	GTPGpSSPYApSPR	S5, S10	394, 399
Q3UHZ5	YEpSIDEDELLASLSPEELK	S3	15
Q3UM45	RVEpSEEpSGDEEGKK	S4, S7	24, 27
Q3UMF0	TLSSPTGTETNPPK	S3/S4	896/897
Q3UQS2	LYVVDpSINDLNK	S6	24
Q3UQS8	SGSPGPLHSVSGYK	S1/S3	726/728

Q3UTJ2	RKpSEPAVGPLR	S3	339
Q3UTJ2	SFISSPSSPSR	S8/S9	381/382
Q4FJU9	RGSgsAEGEVEASQLR	S5/S3	129
Q5DTJ9	TPVDEpSDDEIEHDEIPTGK	S6	924
Q5DTJ9	SRLpSPALSHR	S4	1042
Q5EBG6	RApSAPLPGFSAPGR	S3	16
Q5FW52	AEYVFIVDpSDGEDEATCR	S9	85
Q5I1X5	AVLPGpSPIFSR	S6	394
Q5U4C3	APpSPAPAVpSPK	S3, S9	676, 682
Q6IR34	ApSVGSLPGLR	S2	567
Q6NZJ6	KAApSLTEDR	S4	1211
Q6NZJ6	pSFSKEVEER	S1	1187
Q6P4S6	RApSDGGANIQLHAQQLLK	S3	493
Q6P542	QLpSVPASDEEDEVPAPIPR	S3	103
Q6PCP5	ERpSMSENAVR	S3	129
Q6PDH0	KLpSSGDLR	S3	565
Q6PDH0	TLQPPEpSPR	S7	445
Q6PDH0	SPpSPTLGESLAPR	S3	522
Q7TMY8	GSGTApSDDEFENLR	S6	1907
Q7TPW1	EMLApSDDEEESSPK	S5	16
Q7TPW1	TVpSQESLTPGK	S3	296
Q7TQD2	RLSLESEGANEGATAAPELSALEEAFR	S3/S6	31/34
Q7TQG1	pSIHEVDISNLEAALR	S1	992
Q8BG95	KTGSHNMLSEVANSR	T2/S4	444/446
Q8BG95	RLpSSLFNK	S3	420
Q8BG95	RLpSSTSDIEEK	S3	502
Q8BGC0	VLDEEGpSER	S7	613
Q8BGT6	APSApSPLAIHASR	S5	496
Q8BGU5	SAPsADNLILPR	S3	326
Q8BGV8	AISAPTpSPTR	S7	59
Q8BH64	GPDEAIEDGEEGpSEDDAEWVVK	S13	438
Q8BL43	THESApSVER	S6	221
Q8BL97	SGSIIGSR	S1/S3	210/212
Q8BRK8	SCpSAAGLHR	S3	491
Q8BTI8	SEQPLSQVLPSLpSPEHK	S13	1216
Q8BTI8	TpSPLMLDR	T1/S2	2350/2351
Q8BTI8	pSPVPSAFSDQSR	S1	2404
Q8BTI8	VSpSPVLETVQQR	S3	1359
Q8BTI8	SSSPVTELTAR	S2	1068
Q8BTI8	RSpSSELSPEVVEK	S3	1340
Q8BVZ1	SMpSQAMDMVLGK	S3	163
Q8BWB1	SLTNQSDWDSPYLDMEAR	S1/T3	342/344
Q8BWB1	pTPPPMAPK	T1	702
Q8BWB1	SPSPGELQVLSPLSPLSPEP-		
	PGAPVSQALQPTSLR	S1/S3	92/94
Q8BWB1	RFSTPAPQPTAEPLAPTVLVPR	S3/T4	891/892
Q8BZ03	RLpSSTSLASGHSVR	S3	189
Q8C0R0	pSGLLENRTEK	S1	197
Q8C9H6	AASPPSYTLDLGESQLAPPPSK	S3/S6/T8	328/331/333
Q8C079	AASPPASASDLIEQQQK	S3/S7/S9	335/339/341
Q8CC35	AASPAKPSpSLDLVPNLPR	S3	839
Q8CC35	DRApSPAAAEAVPEWASCLK	S4	672
Q8CC35	pSPVLER	S1	535
Q8CC35	VASLpSPAR	S5	765
Q8CC35	VApSEEEVPLVVYLK	S3	258
Q8CGB6	HLPGSGQQPpSPPAR	S10	1087
Q8CHG7	SETSPVAPR	T3/S4	663/664
Q8CHW4	AGpSPQLDDIR	S3	540
Q8CI12	SPpSVEHDEASDLEVR	S3	131

Q8CI51	RGpSQGDIK	S3	228
Q8CJ53	VPpSDSSLGTPDGRPELR	S3	296
Q8K1Z0	YTDQpSGEEEEEDYESEEQLQHR	S5	81
Q8K2F8	SSPQLDPLRK	S1/S2	182/183
Q8K2F8	SPTMEQAVQTASAHLPAPAPVGR	S1/T3	192/194
Q8K2K6	GTPSQpSPVVGR	S6	181
Q8K2Z4	RTpTPIR	T3	1380
Q8K3H0	VNQSALEAVTPpSPSFQQR	S12	401
Q8K4G5	STpSQGSINSPVYSR	S3	496
Q8K4G5	STSQGpSINSPVYSR	S6	499
Q8K4G5	STpSQGpSINSPVYSR	S3, S6	496, 499
Q8K4G5	TLpSPTPSAEGYQDVR	S3	475
Q8K4G5	TLpSPTPpSAEGYQDVR	S3/S7	479
Q8K4G5	QpSLGEpSPR	S2, S6	466, 470
Q8K4G5	QpSLGEpPR	S2	466
Q8K4G5	QpLGEpSPR	S6	470
Q8K4G5	SpSGREEDEEELLR	S2	671
Q8K4I3	KApSEEEYVIR	S3	639
Q8K4L3	RGpSLELGNPSAAHLGDELK	S3	960
Q8K4L3	SLpSDYTGPpQLQVPR	S3	510
Q8K4L3	LPpSPTVAR	S3	728
Q8K4Q0	ILDTSSTQSAPApSPTNK	S14	863
Q8K4Z3	RGpSETMAGAAVK	S3	43
Q8K019	IDIpSPSALR	S4	656
Q8K124	SSpSLGDLLR	S3	395
Q8K558	SSDSGLPSDIPHVR	S1/S2	228/229
Q8N7N5	GHGHpSDEEDEEQPR	S5	100
Q8R1B4	QPLLLpSEDEEDTKR	S6	39
Q8R4H2	VAEHGpTPKPFRR	T6	736
Q8R361	TYpSDEASQLR	S3	307
Q8R550	ASSPSLFSTEGKPK	S2/S3	631
Q8VDD5	KGTGDCSDEEVDGKADGADAK	T3/S7	1943
Q8VDN2	EVSMDDHKLpSLDELHR	S10	47
Q8VH51	DKpSPVREPIDNLTPEER	S3	136
Q8VHH7	THEIpSVR	S5	39
Q8VHX6	LGpSFGSITR	S3	2234
Q9CQF4	EADEEDpSDEETSYPER	S7	106
Q9CR86	TFpSATVR	S3	53
Q9CR86	GNVVPpSPLPTR	S6	42
Q9CWE0	NAPSVPNLR	S3	100
Q9CWE0	ASSFADMMGILK	S2/S3	234/235
Q9CY58	SKSEEAHAEDSVMDHHFR	S1/S3	327/329
Q9CZ2	NSATFKpSFEDR	S7	180
Q9CZ44	KKpSPNELVDDLK	S3	114
Q9CZ44	RRHpSGQDVHVVLK	S4	176
Q9CZJ2	SIDSpSFR	S5	280
Q9CZJ2	pSIDSSFR	S1	276
Q9CZJ2	pSIDSpSFR	S1, S5	276, 280
Q9CZJ2	SPVPpSPPGpSPR	S5, S9	25, 29
Q9CZJ2	SPVPpSPPGSPR	S5	25
Q9D0F9	AIGGIILTApSHNPGGPNGDFGIK	S10	117
Q9D0V7	KLpSGDQITLPTTVDYSSVPK	S3	36
Q9D1L0	RAPAAQPPAAAAPSAVGpSPAAAAPR	S18	45
Q9D2N4	SSPPKDSEVEQNK	S1/S2	362/363
Q9DBC7	EDEIpSPPPPNPVVK	S5	83
Q9DBR7	KTGSYGALAEISASK	T2/S4	445
Q9DBS9	ALVHQLpSNESR	S7	405
Q9DC77	RKEpSTPETEEGAPTTSEEK	S4/T5	36/37
Q9DCF9	KLpSEADNR	S3	105

Q9DCT8	KTpSGPPKGPSK	S3	104
Q9EQN3	VEVESGGSAAApTPPLSR	T12	219
Q9EQW7	RApSNQELTEVGR	S3	1600
Q9ET54	IApSDEEIQGTK	S3	901
Q9ET78	TpSLGSQR	S2	231
Q9ET78	TpSLSSLR	S2	162
Q9ET78	ETPQPEGPPpSPAGpTPPQPK	S11	479, 483
Q9ET78	RSDpSAPPSPVSATVPEEEPPAPR	S4	593
Q9ET78	RSDpSAPPpSPVSATVPEEEPPAPR	S4, S8	593, 600
Q9ET78	EpSPQLHER	S2	462
Q9JHU2	MELpSPSRAPSPGK	S4, S9	370, 375
Q9JHU2	VlpSPGPNFQER	S3	278
Q9JHU2	SGPQCSSPTCQEETEDVR	S1/S6/S7/T9	379/384/385/387
Q9JI91	MLDAEDIVNpTPKPDER	T10	237
Q9JI99	RNpSLTGEEGELVK	S3	101
Q9JIX8	SLpSPLSGTTDTK	S3	479
Q9JJG0	VQNpSPPVGR	S4	419
Q9JJW5	pSPNPENIAPGYSGPLK	S1	116
Q9JJW5	VDGSNLEGGSSQQGPSpTPPNpTPDPR	T16, T20	107, 111
Q9JJW5	KVpSIPR	S3	37
Q9JK92	pSPPFPGEPPWK	S1	87
Q9JKB3	pSRPLNAVSDQDGK	S1	328
Q9JKS4	DPALDTNGSLApTPSPpSPEAR	T12, S16	119, 123
Q9JKS4	DPALDTNGSLApTPSPpSPEAR	S16	123
Q9JKS4	ASSEGAQGSVpSPK	S11	179
Q9JKS4	RPIPISTTAPPIQpSPLPVIPHQK	S14	98
Q9JLN9	KLHVpSTINLQK	S5	1261
Q9JLV1	SQSPAASDCSSSSSSASLPSSGR	S1/S3	176/179
Q9JLV1	SSLGSHQLPR	S1/S2	200/201
Q9JLV1	AAPpSPAPAEPAAPK	S4	404
Q9JLV1	pSPPPAEKVEVK	S1	360
Q9JLV1	VSSAPIPCPSPSPAPSAVPpSPPK	S20	390
Q9QXS1	RApSFAEK	S3	1729
Q9QYB5	TEEVLSPDGSPSKpSPSK	S14	681
Q9QYG0	TApSLTSAApSIDGSR	S3, S9	332, 338
Q9QYG0	SRTApSLTSAApSIDGSR	S1/T3, S5	328/330, 332
Q9QYG0	TApSLTSAASIDGSR	S3	332
Q9QYG0	TASLTSAApSIDGSR	S9	338
Q9R0L6	VTNAIpSPESPpGVGR	S6	65
Q9R0Q7	DWEDDpSDEDMSNFDR	S6	113
Q9R078	pSQNNFVAILDLPEGEHQYK	S1	108
Q9WTX2	EDpSGTFSLGK	S3	18
Q9WUB3	KQlpSVR	S4	15
Q9Z0X4	RTpSLPCIPR	S3	310
Q9Z1D1	GIPLPTGDTSPPELLPGDPLPPK	T9/S10	41/42
Q9Z1E4	HSSPHQSEDEEEPR	S2/S3	652/653
Q9Z1E4	HSSPHQpSEDEEEPR	S2/S3, S7	652/653, 657
Q9Z1P7	SpSPAPNPALASPGPAQLQLVR	S1/S2	167/166
Q9Z2I9	INFDPNSAYR	S5	279
Q52KI8	REpSPSPAPKPR	S3	448
Q52KI8	EKpSPELPEPSVR	S3	220
Q65CL1	TPEELEDVpSDLEDDHEVR	S9	637
Q65CL1	pSHTSIQTEGK	S1	647
Q70KF4	RHpSDTDDGPGMYFEK	S3	2905
Q70KF4	ETSPpSPLSPEVEHR	S5	769
Q70KF4	GpSFSSTPELGHTSLLLLK	S2	1083
Q80TV8	SRpSDIDVNAAASAK	S1/S3	598/600
Q80UU9	LLKPGEEPSEYpTDEEDTKDHSK	T12	205
Q91VW5	VPpSMESLFR	S3	93

Q91W69	TPVLPSGPPIADPWAPSpSPTR	S17/S18	386/387
Q91W92	RSDpSLLSFR	S4	207
Q91W98	DRGPEApTR	T7	194
Q91WK0	RGSgDpTSSLIDPDTSLSELR	T6/S7/S8	111/114/116
Q91YE8	AQpSPTPSLPASWK	S3	895
Q91YE8	GCVApSPVEGGR	S5	300
Q99JB8	GGRpSPDEVTLTSIVPTR	S4	319
Q99KI0	VDVpSPTSQR	S4	559
Q99L43	LDGETApSDSESR	S7	32
Q99L88	GSGTGHVPVGVAQAPDpSPAGVR	S17	86
Q99M08	RGpSFEAGR	S3	19
Q99MR9	RGSgSpSEDMYLDTPTSASR	S3/S5/S6	48/50/51
Q99MR9	ATFKPGFpSPQPSR	S8	40
Q99MS7	LGDpTPEAPPR	T4	448
Q99MS7	GQGSEPAAITGGQVGPET- PEPPpSPPETR	S24	284
Q99P72	RGSgSVDETLFALPAASEPVPSSAEK	S3/S5	165/167
Q99PL6	GKpSPQLALR	S3	36
Q149B8	APHSPESPghpSDNPQSSPDSLEASPR	S4/S7/S11	156/159/163
Q569Z6	IDIpSPSTFR	S4	679
Q569Z6	ASVSDLpSPR	S7	243
Q569Z6	NKKpSPEIHR	S4	669
Q921C5	pSPVLLPK	S1	578
Q924C5	RLpSGVEEAVLSTPVR	S3	230
Q924C5	KlpSPDR	S3	219
Q01815	AlpSGDLTAEELDK	S3	1670
Q02248	RpTSMGGTQQQFVEGVR	T2/S3	551/552
Q02257	ALMGpSPQLVAAVVR	S5	182
Q02257	RVpSVELTNSLFK	S3	665
Q02357	IPCvpTPETVVIR	T5	862
Q02566	GKLpSYTQQMEDLKR	S4/T5	1309/1311
Q02566	KMEpSDLTQLQTEVEEAVQECR	S4/T7	1734/1736
Q02566	NLQEEIpSDLTEQLGEGGK	S7	1512
Q04735	KISTEDINKR	S3/T4	110/111
Q05512	VPApSPLPGLDR	S4	453
Q60932	LTFDSSFpSPNTGKK	S8	117
Q61136	KKpSPIVNER	S3	278
Q61136	pSKpSPVDLR	S1, S3	292, 294
Q61165	LDpSPTLSR	S3	697
Q61234	QPSSPGPQPR	S3/S4	194/195
Q61234	NSAGGTSVGWDpSPPASPLQR	S12	183
Q61235	GPAGEASApSPPVR	S9	90
Q61235	GLGPPpSPPAPPR	S6	75
Q61584	AINGPTSApSGDEIPKLPR	S9	643
Q61699	IEpSPKLER	S3	810
Q61703	pTILDDLRL	T1	335
Q62077	EGpSFEAR	S3	1248
Q62093	TSPDTLR	T1/S2	25/26
Q62234	DALLGSNPKNKpSPPSSPSSR	S12	863
Q62261	RPPpSPDPNTK	S4	2102
Q62261	AQTLPTSVVTITSESpSPGKR	S16	2340
Q62261	GDQVSQNGLPAAEQGpSPR	S15	2137
Q62407	AApSVELPQR	S3	2042
Q62407	ApSPVLAVR	S2	2451
Q62407	RLpSSTLER	S3	2462
Q62407	MPpSIPEEPEHGDRL	S3	1177
Q62407	RLpSLSLSQK	S3	2413
Q62407	LSLSLpSQK	S6	2417
Q62407	RLpSLSLpSQK	S3, S7	2413, 2417

Q62407	RGpSSAESALPR	S3/S4	2020
Q62407	GSpSAESALPR	S3	2021
Q62407	RGpSpSAESALPR	S3, S4	2020, 2021
Q62407	ATpSEGESLR	S3	2498
Q62407	pTPPVLAEK	T1	2303
Q62407	SALLPPPpSPR	S8	316
Q62407	VApSPPPGVSEK	S3	2288
Q62407	GpTPDSPAQPAAAPR	T2	2774
Q62407	AApSSEAAPHHQPPESR	S3	2114
Q62407	SDpSPPAPLRPWVPLR	S3	423
Q62407	SSpSFSQGEAEPR	S1/S2/S3	2133/2134/2135
Q62417	DlpSPEEIDLK	S3	345
Q62417	YpSFSDDTK	S2	254
Q62417	RAGEQDPVPTPAELTpSPGR	T15/S16	184/185
Q62417	GTPSSSPVpSPQESPK	S9	58
Q62417	REpSDGTPGGLASLENER	S3	432
Q62448	TQpTPPLGQTPQLGLK	T3	507
Q63918	SSPFKVpSPLSFGR	S7	293
Q63918	SSPFKVSPLSFGR	S1/S2	287/288
Q63918	SpSPFKVpSPLSFGR	S1/S2, S7	287/288, 293
Q63918	DEEALEDpSAEEK	S8	218
Q64012	LPAPQEDTASEAGpTPQGGEVQTR	T14	274
Q64727	DPNApSPGDAGEQAIR	S5	290
Q64727	GQGApSPVAMQK	S5	346
Q64727	pSLLDASEEAIKK	S1	721
Q64727	GWLRDPNApSPGDAGEQAIR	S9	290

